



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Александра Вранић

**ЦИРКУЛИШУЋЕ МИКРОПАРТИКУЛЕ И БИОМАРКЕРИ
ОКСИДАЦИОНОГ СТРЕСА КОД ПАЦИЈЕНАТА
ОБОЛЕЛИХ ОД РЕУМАТОИДНОГ АРТРИТИСА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Коментори:

**др сци. мед. Александра Антовић, ванредни професор
др сци. мед. Мирјана Веселиновић, доцент**

Крагујевац, 2019. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Александра Вранић	
Датум и место рођења: 29.07.1990., Крагујевац, Република Србија	
Садашње запослење: Асистент на предмету Клиничка фармација, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Циркулишуће микропартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса	
Број страница: 188	
Број слика: 9 слика, 57 табела, 54 графика	
Број библиографских података: 250	
Установа и место где је рад израђен: 1. Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Институт Факултета медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац 2. Каролинска Институт, Стокхолм, Шведска	
Научна област (УДК): Медицина	
Коментори:	др сци. мед. Александра Антовић, ванредни професор др сци. мед. Мирјана Веселиновић, доцент
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 15.11.2017.	
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-97/19 од 07.02.2018	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; Проф. др Небојша Анђелковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан; Проф. др Милан Петронијевић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: Проф. др Владимир Јаковљевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, председник; Проф. др Небојша Анђелковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан; Проф. др Милан Петронијевић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан.	
Датум одбране дисертације:	

САЖЕТАК

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

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

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

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

Закључак: Микропартикуле које потичу од тромбоцита могу бити потенцијални биомаркер за тромбоцитну реактивност у РА која представља предиктор за настанак тромбозе и повећање кардиоваскуларног ризика. Параметри глобалних хемостатских метода могу бити корисни у дијагностиковању и праћењу хиперкоагулационог стања код пацијената са РА. Код пацијената са реуматоидним артритисом постоји потреба за суплементацијом антиоксиданса.

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

ABSTRACT

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

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

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

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

Conclusions: Platelet-derived microparticles could be a potential biomarker for platelet reactivity in RA, which is a predictor of thrombosis and increased cardiovascular risk. Global hemostatic methods can be useful in hypercoagulation diagnosing and monitoring in patients with RA. Furthermore, in patients with rheumatoid arthritis there is a need for supplements containing antioxidants.

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

Неизмерну захвалност дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу са којим сам направила своје прве истраживачке кораке и упловила у свет науке. Хвала на свестраној и професионалној подршци и помоћи, на пруженом знању, свему ономе што сам од Вас научила, за све стручне и пријатељске савете. Драги професоре, велико је задовољство и привилегија бити део Вашег успешног тима и Ваш сарадник. Посебно Вам хвала на поверењу које сте ми указали приликом мог одласка у Шведску и изради дела докторске дисертације на Каролинска Институту.

Мојим драгим менторкама, проф. др Александри Антовић и доц. др Мирјани Веселиновић, изражавам неизмерну захвалност на несебичној помоћи и разумевању од првог дана наше сарадње и током целог процеса израде и писања докторске дисертације, на свим идејама и корисним саветима, предлозима и подршци.

Захваљујем се проф. др Јовану Антовићу, Иви Прунер, Јанан Зонг и осталим члановима тима који су ми помогли у истраживачком раду на Каролинска Институту у Стокхолму.

Велику захвалност дугујем целој екипи Лабораторије за кардиоваскуларну физиологију, својим драгим колегама и пријатељима: Владимиру Живковићу, Ивану Срејовићу, Невени Јеремић, Јовани Брадић, Јовани Јеремић, Аници Петковић, Марку Равићу, Тамари Николић Турнић, Исидори Милосављевић, Маријани Анђић, Марини Ранковић, Невени Драгинић, Катарини Радоњић, Маји Савић, Јасмини Сретенковић, Љиљани Ђоковић и Предрагу Равић, на сарадњи у свакодневним истраживачким обавезама, за пренесено знање, отвореност и спремност да ми увек изађу у сусрет, на свим добронамерним саветима и сугестијама током дугогодишњег заједничког рада.

Захваљујем се својим драгим колегама са Катедре за Клиничку фармацију. Хвала Вам на подршци и разумевању приликом мог одсуства и на свим лепим и пријатељским тренуцима.

Изузетну захвалност дугујем пријатељу и колеги Душану Томашевићу на сугестијама, идејама, стрпљењу и помоћи приликом техничког сређивања доктората.

Посебну захвалност дугујем свом супругу и пријатељу Немањи, својој породици и пријатељима, за велики оптимизам, снагу и ветар у леђа и онда када није све ишло по плану, за подршку и мотивацију, на свим речима којима су ме охрабривали и подстицали.

На крају велико хвала баби и деди на свему што су учинили за мене и за сву безусловну љубав коју су ми пружили. Својим личним примером и делима били су ми најбољи узор! Стигли смо до још једног заједничког циља, а знам да их је још много пред нама!

...баба Радмили и деда Ратку...

Ваша Александра

1. УВОД.....	2
1.1. АУТОИМУНЕ БОЛЕСТИ.....	2
1.2. РЕУМАТОИДНИ АРТРИТИС.....	2
1.2.1. Епидемиологија	3
1.2.1.1. Инциденца и преваленца	3
1.2.2. Патогенеза болести.....	4
1.2.2.1. Хормонски дисбаланс	4
1.2.2.2. Генетски фактори	6
1.2.3. Реуматоидни артритис и менопауза.....	6
1.2.4. Клиничка слика реуматоидног артритиса.....	7
1.2.5. Реуматоидни артритис и ризик од кардиоваскуларних болести.....	7
1.2.6. Реуматоидни артритис: терапијске могућности	8
1.3. МИКРОПАРТИКУЛЕ.....	10
1.3.1. Настанак микропартикула	10
1.3.2. Подела и врста микропартикула	12
1.3.3. Микропартикуле и улога у патогенези болести	12
1.3.4. Микропартикуле и реуматоидни артритис	13
1.3.5. Улога микропартикула у ендотелној дисфункцији.....	15
1.3.6. Микропартикуле и хемостаза. Улога у коагулацији и фибринолизи	16
1.4. ХЕМОСТАЗНИ СИСТЕМ.....	17
1.4.1. Коагулација	17
1.4.1.1. Тромбин.....	17
1.4.1.2. Фибрин	18
1.4.2. Природни антикоагуланси	19
1.4.3. Фибринолиза	19
1.4.4. Карбоксипептидаза Б ₂ (син. <i>thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor</i> (ТАФИ), карбоксипептидаза У, плазма карбоксипептидаза Б).....	20
1.4.5. Коагулациони систем и инфламација. Реуматоидни артритис	21
1.5. ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС	23
1.5.1. Слободни радикали	23

1.5.2. Антиоксидациони систем заштите.....	25
1.5.3. Улога оксидационог стреса у реуматоидном артритису	25
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	28
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД.....	31
3.1. ИСПИТАНИЦИ.....	31
3.1.1. Контролна група	31
3.1.2. Експериментална група.....	32
3.2. АНАМНЕСТИЧКИ ПОДАЦИ	33
3.3. МЕТОДЕ КЛИНИЧКЕ ПРОЦЕНЕ АКТИВНОСТИ БОЛЕСТИ	35
3.3.1. Метода процене активности реуматоидног артритиса (<i>DAS28-Disease Activity Score</i>).....	35
3.3.2. Метода процене функционалног статуса пацијената са РА.....	36
3.4. МЕТОДЕ ЛАБОРАТОРИЈСКИХ ИСПИТИВАЊА.....	37
3.4.1. Узорковање крви.....	37
3.4.2. Методе обраде узорака крви.....	37
3.4.2.1. Обрада узорака крви за одређивање врсте и концентрације микропартикула.....	37
3.4.2.2. Обрада узорака крви за одређивање глобалних метода хемостазе	37
3.4.2.3. Обрада узорка крви за одређивање параметара оксидационог стреса и параметара антиоксидационе заштите	38
3.4.3. Методе одређивања биохемијских параметара	38
3.4.4. Методе одређивања хематолошких параметара	40
3.4.5. Методе процене серопозитивности/серонегативности.....	41
3.4.6. Методе одређивања параметара хемостазе	41
3.4.7. Општи тестови хемостазе	42
3.4.8. Метода клиничке процене коштане густине.....	42
3.5. ГЛОБАЛНЕ МЕТОДЕ ХЕМОСТАЗЕ	43
3.5.1. Ендогени тромбин потенцијал	43
3.5.2. Укупни хемостатски потенцијал.....	45
3.5.3. Време фибринолизе угрушка.....	48

3.5.4. Методе анализе турбидиметријских података (анализа формирања угрушака).....	49
3.6. ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА	50
3.7. МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊЕ МИКРОПАРТИКУЛА	51
3.7.1. Концентрација микропартикула.....	51
3.7.1.1. Одређивање укупне концентрације микропартикула.....	51
3.7.2. Врста микропартикула	52
3.7.3. Одређивање концентрације појединачних микропартикула.....	52
3.8. МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА ПАРАМЕТАРА РЕДОКС СТАТУСА.....	55
3.8.1. Методе одређивања параметара оксидационог стреса	55
3.8.2. Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог статуса.....	55
3.8.2.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)	55
3.8.2.2. Одређивање водоник пероксида (H ₂ O ₂).....	56
3.8.2.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O ₂ ⁻).....	58
3.8.2.4. Одређивање нитрита (NO ₂ ⁻).....	59
3.8.3. Методе одређивања параметара антиоксидационог система заштите	61
3.8.4. Супстанце и реагенси за одређивање параметара антиоксидационе заштите	61
3.8.4.1. Одређивање каталазе (CAT).....	61
3.8.4.2. Супероксид дисмутаза (SOD)	62
3.8.4.3. Одређивање редукованог глутатиона (GSH).....	62
3.8.5. Статистичка обрада података	64
4. РЕЗУЛТАТИ	66
4.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА	67
4.1.1. Демографске карактеристике испитаника.....	67
4.1.1.1. Активност реуматоидног артритиса.....	67
4.1.2. Демографске карактеристике испитаника на основу менопаузе	69
4.1.2.1. Активност реуматоидног артритиса праћена на основу менопаузе...	69
4.1.3. Придружене болести испитаника.....	71
4.1.4. Придружене болести испитаника на основу менопаузе	72

4.2. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ АНАЛИЗЕ.....	73
4.2.1. Утицај реуматоидног артритиса на биохемијске параметре	73
4.2.2. Утицај менопаузе на биохемијске параметре	74
4.2.3. Утицај реуматоидног артритиса на хематолошке параметре.....	77
4.2.3.1. Крвна слика.....	77
4.2.3.2. Леукоцитарна формула.....	78
4.2.4. Утицај менопаузе на хематолошке параметре.....	79
4.2.4.1. Крвна слика.....	79
4.2.4.2. Леукоцитарна формула.....	80
4.2.5. Утицај реуматоидног артритиса на хематостатске параметре.....	81
4.2.6. Утицај менопаузе на хемостатске параметре.....	81
4.2.7. Параметри за одређивање серопозитивности/серонегативности	82
4.3. МИКРОПАРТИКУЛЕ – ВРСТА И КОНЦЕНТРАЦИЈА МИКРОПАРТИКУЛА... 83	
4.3.1. Укупна концентрација микропартикула	83
4.3.2. Концентрација различитих врста микропартикула у контролној и експерименталној групи.....	85
4.3.2.1. Концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита (CD42 ⁺).....	85
4.3.2.2. Микропартикуле које потичу од тромбоцита (CD42 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	87
4.3.2.3. Концентрација микропартикула које потичу од моноцита (CD14 ⁺)..	88
4.3.2.4. Микропартикуле које потичу од моноцита (CD14 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	90
4.3.2.5. Концентрација микропартикула које потичу од леукоцита (CD45 ⁺) .	91
4.3.2.6. Микропартикуле које потичу од леукоцита (CD45 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	93
4.3.2.7. Концентрација микропартикула које потичу од ткивног фактора (CD142 ⁺).....	94
4.3.2.8. Микропартикуле које потичу од ткивног фактора (CD142 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	96
4.3.2.9. Концентрација микропартикула које потичу од ендотела (CD144 ⁺) .	97

4.3.2.10. Микропартикуле које потичу од ендотела (CD144 ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	99
4.3.2.11. П-селектин (CD62P ⁺) у контролној и експерименталној групи	100
4.3.2.12. Микропартикуле које потичу од П-селектина (CD62P ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	102
4.3.2.13. Е-селектин (CD62E ⁺) у контролној и експерименталној групи.....	103
4.3.2.14. Микропартикуле које потичу од Е-селектина (CD62E ⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS ⁺ /PS ⁻	105
4.4. ГЛОБАЛНЕ МЕТОДЕ ХЕМОСТАЗЕ	108
4.4.1. Утицај реуматоидног артритиса на стварање тромбина праћен ендогеним тромбин потенцијалом	108
4.4.2. Утицај менопаузе на настанак тромбина праћен ендогеним тромбин потенцијалом.....	109
4.4.3. Утицај реуматоидног артритиса на настанак фибрина праћен укупним хемостатским потенцијалом	109
4.4.4. Утицај менопаузе на настанак фибрина праћен укупним хемостатским потенцијалом.....	110
4.4.5. Типичне криве агрегације фибрина и фибринолизе	111
4.4.6. Receiver operating characteristic (ROC) крива	112
4.4.6.1. Укупни хемостатски потенцијал	112
4.4.6.2. Ендогени тромбин потенцијал.....	115
4.4.7. Утицај реуматоидног артритиса на време лизирања угрушка (<i>CLT- Clot Lysis Time</i>).....	116
4.4.8. Утицај менопаузе на време лизирања угрушка (<i>CLT- Clot Lysis Time</i>).....	117
4.4.9. Турбидиметрија – анализа параметара фибринског угрушка и његове структуре	119
4.4.10. Утицај менопаузе на параметре турбидиметрије	120
4.5. ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА	121
4.5.1. Контрола у пременопаузи	121
4.5.2. Контрола у менопаузи	122
4.5.3. Пацијенткиња у пременопаузи	123
4.5.4. Пацијенткиња у менопаузи.....	124

4.6. РЕДОКС СТАТУС	126
4.6.1. Параметри оксидационог стреса	126
4.6.1.1. Водоник-пероксид (H_2O_2).....	127
4.6.1.2. Супероксид анјон радикал (O_2^-).....	128
4.6.1.3. Нитрити (NO_2^-).....	129
4.6.1.4. Индекс липидне пероксидације (TBARS).....	130
4.6.2. Параметри антиоксидационе заштите	131
4.6.2.1. Каталаза (CAT)	132
4.6.2.2. Супероксид-дисмутаза (SOD).....	133
4.6.2.3. Редуковани глутатион (GSH).....	134
4.7. КОРЕЛАЦИЈА.....	135
5. ДИСКУСИЈА.....	142
5.1. УТИЦАЈ РЕУМАТОИДНОГ АРТРИТИСА НА МИКРОПАРТИКУЛЕ.....	143
5.2. УТИЦАЈ РЕУМАТОИДНОГ АРТРИТИСА НА ХЕМОСТАЗУ	149
5.3. УТИЦАЈ МЕНОПАУЗЕ НА ХЕМОСТАЗУ	151
5.4. УТИЦАЈ РЕУМАТОИДНОГ АРТРИТИСА И МЕНОПАУЗЕ НА ФИБРИНСКИ УГРУШАК	154
5.5. УТИЦАЈ РЕУМАТОИДНОГ АРТРИТИСА НА ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС КОД ЖЕНА	155
5.6. УТИЦАЈ МЕНОПАУЗЕ НА ОКСИДАЦИОНИ СТРЕС	159
5.7. УТИЦАЈ РЕУМАТОИДНОГ АРТРИТИСА НА НЕСПЕЦИФИЧНЕ МАРКЕРЕ ИНФЛАМАЦИЈЕ	161
5.8. УТИЦАЈ МЕНОПАУЗЕ НА МИНЕРАЛНУ ГУСТИНУ КОСТИЈУ.....	162
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	165
7. ЛИТЕРАТУРА.....	168

I

УВОД

1. УВОД

1.1. Аутоимуне болести

Аутоимуне болести дефинишу се као низ различитих обољења од орган-специфичних до системских поремећаја, који настају као последица губитка имунолошке толеранције организма на властите антигене (1, 2).

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

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

1.2. Реуматоидни артритис

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

Реуматоидни артритис погађа скоро 1% укупне светске популације при чему је однос обољевања од реуматоидног артритиса 6:1 у корист популације жена код млађих испитаника и 2:1 у старијој животној доби између 55-64 године (8, 10). Код особа старијих од 75 година, овај однос се или изједначава или стопа обољевања расте у корист мушке популације. Најчешћи почетак болести је у четрдесетим годинама живота (4). Недавна истраживања указују да поред полне разлике у инциденци обољевања од реуматоидног артритиса, постоји значајна разлика у активности болести између полова. Значајно већа активност болести је у женској популацији у односу на

мушкарце (11). Поред тога, жене су у повећаном ризику за развој већег броја аутоимуних болести истовремено (12).

РА представља хетерогену болест која се манифестује различитом клиничком сликом и патогенетским механизмима између оболелих појединаца. Иако су аутоантитела важна карактеристика РА (серопозитивни РА) неки пацијенти немају присутна аутоантитела (серонегативни РА). РА карактерише присуство аутоантитела на имуноглобулин Г (IgG је реуматоидни фактор) и цитрулисане протеине (антитела на циклични цитрулисани пептид) (13).

Пацијенти са РА имају повећану стопу морбидитета односно високу преваленцу обољевања од кардиоваскуларних болести као и повећан ризик за развој фаталних кардиоваскуларних догађаја као што су акутни инфаркт миокарда, мождани удар и срчана инсуфицијенција (14). Уколико није лечена на адекватан начин, болест доводи до прогресивног оштећења зглобова и трајног инвалидитета (13).

1.2.1. Епидемиологија

Болест је комплексна и укључује и факторе околине који могу да буду окидач болести код генетски предиспонираних особа (13). Геоепидемиологија показује да код особа које су предиспонирани за развој аутоимуних болести, генетски фактори интерагују са начином живота и факторима околине, укључујући социо-економски статус, инфективне агенсе, загађиваче животне средине, витамин Д (у зависности од изложености сунцу), последично доводећи до развоја болести (2). Када говоримо о социо-економском статусу и утицају околине, доказано је да пушење има највећи утицај на предизпозицију за настанак болести и да је повезано са лошијом прогнозом болести (15).

Поред тога, индиректно је могуће да постоји повезаност између гојазности, резистенције на инсулин, поремећаја коагулације и настанка инфламације ослобађањем проинфламаторних цитокина, фактор некрозе тумора α ($TNF\alpha$) и интерлеукина 6 ($IL-6$) у масно ткиво. Ови проинфламаторни цитокини имају веома важну улогу у патогенези РА (16).

1.2.1.1. Инциденца и преваленца

Реуматоидни артритис има просечну инциденцу обољевања од 0,5 до 1% са тенденцијом смањења од севера ка југу и од урбаних ка руралним подручјима (17).

Јужноевропске земље имају нижу преваленцу у односу на земље Северне Европе и Северне Америке. Нижа преваленца је забележена у земљама у развоју (4).

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

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

1.2.2. Патогенеза болести

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

У патогенезу РА укључено је неколико процеса. Дисрегулација урођеног и стеченог имунског одговора јавља се у различитим фазама болести. Телије урођеног и стеченог имунског система, солубилни медијатори, адхезиони молекули и аутоантитела доприносе развоју запаљења и структурним променама на зглобовима и унутрашњим органима (7).

1.2.2.1. Хормонски дисбаланс

Велики број аутоимуних болести чешће се јавља у женској популацији. Једно од могућих објашњења ове појаве је да хормонски и генетски фактори утичу на имунски систем другачије код жена и мушкараца што би могло да објасни разлику у преваленци обољевања од аутоимуних болести између полова. Ове хипотезе су донекле прихваћене с обзиром да се многе аутоимуне болести јављају или прогредирају приликом хормонских промена као што су касна адолесценција или трудноћа. Разлике у карактеристикама X хромозома између мушкараца и жена који имају аутоимуну болест, навела је истраживаче да мисле да је генетска подлога ове групе болести повезана и са генетским детерминантама пола. Ове хормонске промене као и генетски фактори могли би објаснити зашто су жене склоније развоју аутоимуних болести (3). Када говоримо о разликама између полова, жене имају јачи хуморални и целуларни

имунски одговор у поређењу са мушкарцима и показују повишен однос CD4:CD8 због већег броја CD4 ћелија и већег нивоа циркулишућих антитела (24).

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

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

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

У случајевима када су серумске концентрације естрогена у референтним вредностима, код пацијената са реуматоидним артритисом су детектоване ниже концентрације андрогена у серуму и синовијалној течности (тестостерона, андростендиона и дехидроепиандростерона). Присуство измењене равнотеже полних хормона у синовијалној течности пацијената са реуматоидним артритисом последично доводи до смањене концентрације имуносупресивних андрогена и повећања концентрације имуностимулационих естрогена, што може повољно утицати на развој имунопосредованог синовитиса. Инфламаторни цитокин, фактор некрозе тумора – α

(TNF α), може значајно да стимулише активност ароматазе у периферном ткиву и да индукује периферни метаболизам андрогена у естрогене. Управо због тога, третман блокаторима TNF α утиче на нивое хормона у синовијалној течности пре него на нивое ових хормона у серуму, при чему блокира конверзију андрогена (антиинфламаторних хормона) до естрогена (проинфламаторних хормона), посредовану ароматазом (30). Особе мушког пола, које имају РА, имају смањен ниво слободног тестостерона у серуму, што је у складу са хипотезом да андрогени антиинфламаторни хормони имају протективни ефекат у реуматоидном артритису (31).

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

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

1.2.2.2. Генетски фактори

Реуматоидни артритис је мултифакторијална болест која настаје као резултат интеракције генетских фактора и фактора околине. Главни генетски фактори укључени у патогенезу реуматоидног артритиса су *HLA-DRB1* и тирозин – фосфатазни ген *PTPN22* (15). Позитивна породична анамнеза повећава ризик за настанак РА отприлике три до пет пута, при чему је овај ризик такође повећан код близанаца, што указује на утицај генетских фактора у патогенези болести (5, 35).

1.2.3. Реуматоидни артритис и менопауза

Менопауза се дефинише као изостанак менструације 12 месеци без патофизиолошког узрока. Природно се дешава око педесете године. Постоје различити подаци који указују на повезаност почетка менопаузе, активности и тока болести (8).

Недавна студија је показала да је рана менопауза удружена са повећаним ризиком за настанак РА у постменопаузалном периоду (36), док друга указује рана менопауза, пре 45 године, може бити удружена и блажим током болести (37). Са друге стране, претходна истраживања показују да жене код којих се РА развије у менопаузи имају два пута већи ризик за настанак серонегативног РА као и жене код којих је наступила рана менопауза. Када је у питању постменопаузална хормонална терапија, употреба ових лекова дуже од 8 година била је удружена са повећаним ризиком за настанак серопозитивног РА (38). Такође, већа инциденца јављања РА је код жена у менопаузи, што иде у прилог претходно објашњеној чињеници, да на развој РА утицај има промена равнотеже полних хормона (39).

1.2.4. Клиничка слика реуматоидног артритиса

Почетак РА је обично подмукао при чему се пацијенти жале на један или мањи број отечених зглобова, јутарњу уоченост и неспецифичне симптоме као што су умор и осећај налик грипу. Бол и оток зглобова у раног фази болести може бити асиметрично и не полиартикуларно, док у каснијим фазама болести прелази у симетрични полиартритис који могу да прате орган специфичне и системске манифестације (39, 40). Због тога је неопходна брза и рана дијагностика и почетак терапије. Брзо започињање терапије уједно има и бољу прогнозу. Код млађих жена примећено је погоршање болести непосредно пре менструације (39).

1.2.5. Реуматоидни артритис и ризик од кардиоваскуларних болести

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

Реуматоидни артритис као и велики број других аутоимуних болести сматра се протромботичким стањем. Претходне студије указују да аутоимуне болести,

укључујући РА, представљају фактор ризика за развој кардиоваскуларних болести као и за венски тромбоемболизам, плућну тромбоемболију и дубоку венску тромбозу. Инфламација која постоји у основи РА може да повећа ризик за настанак венског и артеријског тромбоемболизма код ових пацијената (16, 44, 45).

1.2.6. Реуматоидни артритис: терапијске могућности

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

У последњих 30 година број терапеутских агенаса за лечење РА значајно је порастао (49). Тренутно доступни лекови укључују нестереоидне антиинфламаторне лекове, глукокортикоиде, лекове који модификују болест (*DMARDs – disease-modifying anti-rheumatic drugs*) (конвенционалне као што је метотрексат или циљане као што су инхибитори јанус киназа) и биолошке лекове (инхибитори интерлеукина-1 и интерлеукина-6, инхибитори фактора некрозе тумора) (39).

Сматра се да са лековима који модификују болест треба почети одмах након постављања дијагнозе са циљем постизања ремисије или ниске активности болести. Метотрексат треба бити први избор у терапији осим уколико не постоје контраиндикације за примену. У том случају алтернативна терапија подразумева примену лефлуномида и сулфасалазина. Показано је да је терапија метотрексатом удружена са смањеним ризиком за настанак кардиоваскуларних болести (50), док за утицај ниских доза глукокортикоида на ризик за настанак ових обољења, још увек не може да се изведе прецизан закључак (51). Краткотрајна примена глукокортикоида је индикована приликом почетка примене или замене лекова који модификују болест али им треба смањити дозу или у потпуности искључити што пре је могуће. Може се размотрити и интра-артикуларна примена. Са биолошким лековима се започиње када су присутни лоши прогностички фактори, присуство антитела на циклични цитрулисани пептид, позитиван реума фактор, висока активност болести и поред

употребе високих доза метотрексата, ране ерозије. Међутим, биолошки лекови се најчешће комбинују са метотрексатом. Уколико постоји интолеранција на метотрексат, комбинација инхибитора интерлеукина-6 и циљаних лекова који модификују болест, могу имати предност у односу на друге биолошке лекове (52).

Недавне студије су показале да је агресивна имunosупресија антагонистима фактора некрозе тумора, као биолошких антиреуматских лекова који модификују болест, повезана са смањеним ризиком за настанак кардиоваскуларних болести (53). У погледу ефекта на појединачне параметре коагулације, нису објављени свеобухватни подаци о ефекту лекова у терапији РА као што су антиреуматски лекови који модификују болест (*DMARDs*), укључујући и инхибиторе фактора некрозе тумора. Такође, метотрексат у дози од ≥ 20 мг/недељно, циклоспорин А и биолошки лекови имају позитиван ефекат на атеросклерозу (54), услед чињенице да су акутни кардиоваскуларни догађаји углавном повезани са убрзаном атеросклерозом код пацијента са РА. Додатно, биолошки лекови као што су инфликсимаб, цертолизумаб, адалимумаб и етарнецепт, показују побољшање ендотелне дисфункције у погледу супресије про-атеросклеротичних процеса (55). Неколико студија спороведених на пацијентима са РА на терапији инфликсимабом, показале су смањену експресију проинфламаторних цитокина заједно са смањеним вредностима фибриногена и Д-димера као и нормализованим нивоима ткивног активатора плазминогена (*t-PA-tissue-type plasminogen activator*) и инхибитора активатора плазминогена 1 (РАI-1) код ових пацијента током периода праћења терапије (56, 57).

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

1.3. Микропартикуле

Ћелијска комуникација је дефинисана као група процеса који омогућавају дијалог између две или више ћелија организма као одговор на специфичне сигнале. Најједноставнија форма интерћелијске комуникације настаје услед преноса хемијских сигнала између суседних ћелија, директно преко протеинских канала између цитосола суседних ћелија или путем производње сигналних молекула који генеришу три типа комуникације: аутокрину, паракрину и ендокрину. Недавно је откривен нови механизам ћелијске комуникације који је посредован микропартикулама (58).

Општа карактеристика активираних ћелија је способност одвајања фрагмената са њихове плазма мембране. Ови фрагменти представљају хетерогену популацију малих, мембраном-обложених везикула, пречника од 0,1 до 1,0 μm које се називају микропартикуле (МП) и имају важну улогу у физиолошким и патолошким процесима, инфламацији, ангиогенези, ендотелној дисфункцији и тромбози. Прокоагулантни фосфолипиди и специфични рецептори који се налазе на површини микропартикула понашају се као гласници који повезују ове процесе (59, 60).

Микропартикуле су првобитно сматране остацима ћелија али су данас препознате као мултифункционалне структуре које имају улогу у интрацелуларној комуникацији, транспорту компоненти молекула и индукцији ћелијских сигнала, што указује на присуство микропартикула на великом броју биолошки активних молекула (61). Микропартикуле се ослобађају са мембране ћелија током процеса активације, механичког стреса или апоптозе (62). Будући да микропартикуле експримирају различите маркере на својој површини у зависности од њиховог порекла, могу се користити за проучавање ћелијских процеса и патогенеза болести (63). Неколико студија је показало присуство различитих врста нуклеинских киселина на микропартикулама. miRNA која се налази на МП, омогућава интерћелијску комуникацију и комуникацију између органа при чему модификује експресију на циљаним ћелијама. miRNA је присутна на МП здравих особа и показано је да има улогу у регулацији хомеостазе (64).

1.3.1. Настанак микропартикула

Еукариотске ћелије са своје мембране могу да ослободе неколико типова екстраћелијских везикула. Најчешће су класификоване у три велике групе на основу начина настанка и величине ћелија (Табела 1) (65).

Табела 1. Карактеризација екстраћелијских везикула

Класификација	Ексозоми	Микропартикуле	Апоптотичка тела
Величина	30-100 nm	100-1000 nm	50-5000 nm
Механизам настанка	Формирање мултивезикуларних тела унутрашњим бубрењем ендозомалне мембране праћено фузијом са ћелијском плазма мембраном	Стварањем спољашње избочине, односно бубрењем мембране	Фрагментацијом ћелија током апоптотичког процеса
Карактеристике и састав	Богате липидима, ћелијским ендозомалним протеинима, цитоплазматским протеинима, РНК, мРНК	Фосфатидилсерин, липиди, ћелијски протеини са површине мембране, цитоплазматски протеини, РНК, мРНК, понекад ДНК	Фосфатидилсерин, органеле, ДНК, цитоплазматски протеини, РНК, мРНК
Функционалне карактеристике	Селективни пренос терета (функционални протеини, мРНК), интеракција рецептора	Запаљење, коагулација, тромбоза, ангиогенеза, метастазирање тумора, мРНК	Трансфер ДНК фрагмената до фагоцита, инхибиција запаљенских процеса, преживљавање ћелије

Механизам који доводи до настанка микропартикула није у потпуности објашњен. Неколико студија указује да се настанак микропартикула одвија након хемијске и физичке апоптозе, активације ћелија или током оксидационог стреса, под утицајем инфламаторних или прокоагулантних стимулуса (66, 67). Велики број других различитих стимулуса укључен је у процес настанка МП као што су проинфламаторни цитокини (нпр. фактор некрозе тумора- α и интерлеукин-1 β), бактеријски липополисахариди, протеини комплемента (C5b-9), реактивне кисеоничне врсте, хипоксија, инхибитор активатора плазминогена, тромбин као и Ц-реактивни протеин (68).

Током апоптозе, настанак МП се дешава активацијом протеин-киназе 1 и каспазе 3 које доводе до нарушавања структуре мембране, односно бубрења (*"blebbing"*), настанка неправилног испупчења на плазма мембрани и формирања МП. Такође, МП могу да настану као резултат активације ћелија различитим агонистима као што су тромбин и/или колаген (66). Активациони стимулус повећава улазак калцијума, започиње активацију калпаина, што је повезано са калцијум-зависном протеолизом цитоскелетних протеина који су неопходни за даљи процес настанка израштаја на мембрани и настанка МП. Многи аутори су пријавили губитак асиметрије мембране као резултат експозиције фосфатидилсерина на површини ћелија на

унутрашњем омотачу плазма мембране (69). Стимулус који одређује МП, регулише селективно сортирање специфичних састојака који дефинишу састав МП и биолошке информације које оне преносе. Услед тога, МП преносе различите делове једра, цитоплазме и мембране оригиналне ћелије. Експримирају низ површинских маркера који омогућавају карактеризацију ћелијског порекла употребом специфичних антитела (70). Антигени експримирани током активације ћелија могу бити корисни у идентификацији различитих путева ослобађања МП и разликовању патологије и оштећења која том приликом настају (67).

За разлику од апоптотичних ћелија за које је познато да настају у касним фазама апоптозе, МП се ослобађају током ране фазе апоптозе и настају променом цитоскелета ћелијске мембране и формирањем површинског израштаја. Супротно од тога, ексономи настају када се интрацелуларне микропартикуле стапају са ћелијском мембраном. Микропартикуле се одвајају од мембрана егзоцитозом у екстрацелуларну течност (66).

1.3.2. Подела и врста микропартикула

Микропартикуле се деле у три велике групе: тромбоцитне (*platelets-derived MPs* (PMPs)), ендотелне (*endothelium-derived MPs* (EMPs)) и леукоцитне (*leucocyte-derived MPs* (LMPs)). Међутим, микропартикуле могу ослободити све ћелије, при чему оне које се најчешће налазе у крви потичу од тромбоцита, леукоцита и ендотелних ћелија, а могу потицати и од гранулоцита, моноцита, лимфоцита (60, 71). Најраспрострањенији тип микропартикула у крви су микропартикуле које потичу од тромбоцита и резултат су пре свега активације тромбоцита, иако је њихово порекло од мегакариоцита такође могуће (72).

1.3.3. Микропартикуле и улога у патогенези болести

Микропартикуле поседују јаку биолошку активност и учествују у патогенези многих аутоимуних болести (73). Повишен број циркулишућих микропартикула, посебно ендотелних микропартикула, је заједничка карактеристика кардиоваскуларних болести (63).

Микропартикуле које потичу од тромбоцита су одавно идентификоване као транспортни систем за многе прокоагулантне молекуле, као што је ткивни фактор (ТФ). Транспорт и испорука ових молекула може довести до тромбозе а има улогу и у кардиоваскуларним болестима укључујући кардиоваскуларне поремећаје који убрзано

настају код аутоимуних болести (72, 74). Ниво циркулишућих микропартикула који потичу од тромбоцита се мења током различитих болести као што су реуматоидни артритис, системски еритемски лупус, карцином, кардиоваскуларне болести и инфекције, указујући на њихово могуће учешће у прогресији болести (75).

Због познате чињенице и везе између МП које потичу од тромбоцита и кардиоваскуларних болести, постоји претпоставка да повећана експресија МП може објаснити повећану смртност у овој популацији (74).

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

Познато је да су циркулишуће ендотелне МП удружене са атеротромботичким ризиком и могу да обезбеде потенцијалне предиктивне вредности за ова стања. Плазма CD144⁺ ендотелне микропартикуле могу да се користе као предиктивни фактор за будуће кардиоваскуларне догађаје код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом (76). Додатно, ендотелне микропартикуле експримирају адхезионе молекуле (као што су Е-селектин и П-селектин), који могу довести до везивања и активације леукоцита и моноцита. Поред тога, ендотелне МП могу транспортовати велики мултимерни гликопротеин, Фон Вилебрандов фактор, који стабилише агрегацију тромбоцита (66).

1.3.4. Микропартикуле и реуматоидни артритис

Микропартикуле могу да модулирају различите ћелијске процесе, при чему утичу на патогенезу болести које су повезане са инфламацијом. Важни су медијатори и потенцијални биомаркери системске инфламације. Подаци који указују на улогу тромбоцита код упалних артритиса и аутоимуних болести, уједно указују на постојање ”комуникације” између коагулационог система и система инфламације. У зависности од стадијума болести, МП могу послужити као биомаркери за груписање пацијената и евалуацију информација о активацији хемостазе, активности или прогнози болести. Ранија истраживања указују да је ниво серумских МП које потичу од тромбоцита у директној корелацији са активношћу болести (6, 77).

Након активације или смрти ћелија, повишен ниво МП се јавља у различитим аутоимуним болестима, укључујући РА. С обзиром да формирање МП настаје бубрењем ћелијске мембране оригиналне ћелије, може се претпоставити да МП у РА могу транспортовати на своју површину аутоантигене, као што су на пример

цитрулисани протеини, који на овај начин доводе до формирања аутоантитела. Додатно, веза између МП и антицитрулисаних протеинских антитела може индуковати формирање имунских комплекса који доводе до настанка агрегата и преципитата у синовијама или ендотелу, доприносећи инфламацији која је типична за ову патологију (66).

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

Након активације, тромбоцити ослобађају проинфламаторне тромбоцитне МП, које интерагују са леукоцитима доводећи до запаљења зглобова и системске инфламације у РА (78). Микропартикуле које потичу од тромбоцита су присутне у синовијалној течности пацијената са реуматоидним артритисом као и у другим формама инфламаторног артритиса али не и у синовијалној течности пацијената који имају остеоартритис. Микропартикуле које потичу од тромбоцита представљају проинфламаторни фактор који преко IL-1 индукује одговор цитокина. Коришћењем фармаколошког и генетског приступа, рецептор за гликопротеин VI колаген представља окидач за генерацију МП које потичу од тромбоцита у патофизиологији РА (79, 80). Гликопротеин VI је колагени рецептор за тромбоците који се везује за субендотелни колаген након руптуре атеросклеротичног плака (81). Постоји неколико механизма који указују на који начин се тромбоцити активирају и ослобађају микропартикуле у реуматоидном артритису. Тромбоцити се могу активирати преко неколико путева од којих су неки већ мета за превенцију тромбозе; стимулација рецептора тромбоксана A_2 за тромбоците (блокирана помоћу антагонисте овог рецептора SQ 29548), везивање за $P2Y_{12}$ рецептор помоћу аденозин 5' дифосфат (инхибира га клопидогрел) и GPIb-IX комплекс гликопротеина на мембрани тромбоцита који се везује за Вон Вилебрандов фактор. Мишеви или људи којима недостаје гликопротеин VI су здрави, нема развоја реуматоидног артритиса због чега блокирање овог рецептора представља нови терапијски приступ (79).

У реуматоидном артритису односно реуматоидном зглобу, микропартикуле могу стимулирати синовитис преко транспорта цитокина, хемокина, комплемената и фактора ангиогенезе (78, 82). Претходна истраживања указују да су тромбоцити извор МП у синовијалној течности док су моноцити и гранулоцити извор МП у зглобовима (83).

1.3.5. Улога микропартикула у ендотелној дисфункцији

Дисфункција ендотелних ћелија јавља се као заједнички именованељ за различите и врло распрострањене кардиоваскуларне болести. Недавно, повећан број циркулишућих прокоагулантних ендотелних микропартикула пронађен је код пацијената са акутном исхемијом миокарда, прееклампсијом и дијабетесом, што указује на то да ове микропартикуле представљају маркер дисфункције ендотелних ћелија (84). Поред тога, ендотелна дисфункција је повезана са другим васкуларним поремећајима као што су акутни коронарни синдром, коронарна артеријска болест, хипертензија, мождани удар, периферна артеријска болест (68).

У кардиоваскуларним поремећајима, ендотелни антигени CD31 и CD62E, посебно експримирани на микропартикулама током апоптотичке или цитокинске стимулације, могу бити од посебног значаја (67). МП које су настале од активираних/апоптотичких Т ћелија промовишу ангиогенезу кроз повећање адхезионих протеина и проангиогенетичких фактора у ендотелним ћелијама (84).

Селектини који потичу од леукоцита, тромбоцита или ендотелних ћелија, када су експримирани на ћелијама, микропартикулама или циркулишу као солубилна форма, имају снажан допринос иницирању настанка и пропагацији тромба (85). Високи ниво циркулишућих П-селектина је повезан са повећаном тромбозом и настанком запаљења зида вена, док је недостатак П-селектина и Е-селектина повезан са смањењем тромбозе. Генерално посматрано, МП које потичу од леукоцита су повезане са настанком венског тромба. Ови подаци указују на веома важну улогу селектина у венској тромбогенези и показују да П-селектин и МП које потичу од леукоцита могу бити добри циљеви за ограничавање стварања венског тромба (85). Код пацијената са дијабетесом, код којих је познато да долази до развоја убрзане атеросклерозе, пронађене су значајно повишене вредности П-селектина и Е-селектина као и микропартикула које потичу од тромбоцита (86). Претходна истраживања указују на то да инхибиција селектина смањује формирање тромба (87).

1.3.6. Микропартикуле и хемостаза. Улога у коагулацији и фибринолизи

Микропартикуле имају важна прокоагулантна својства, која су заснована на доступности фосфатидилсерина, прокоагулантног аминокиселиног фосфолипида изложеног на површини након стимулације, који је неопходан за ензимске комплексе згрушавања крви, као и на могућем присуству ткивног фактора, главног иницијатора каскаде коагулације (88). С обзиром на чињеницу да је ткивни фактор есенцијалан за хемостазу, повећана експресија ТФ унутар атеросклеротичног плака и повишени нивои микропартикула позитивних на ТФ промовишу тромбозу (89). Експримирање ТФ од стране ћелија зида крвних судова дуго је сматрано обавезним у артеријској тромбози. Апоптотске ћелије глатких мишића и моноцити су главни носачи ткивног фактора до крвних судова – носећи ослобођене МП у крвоток, што је праћено поремећајем или ерозијом атеросклеротичног плака (67).

Поред тога, МП експримирају друге молекуле који могу да утичу на активацију коагулације, укључујући Фон Вилебрандов фактор, који може промовисати стабилност агрегата тромбоцита као и гликопротеин П-селектин, који интерагује са ТФ и посредује везивање за тромбоците и неутрофиле (66).

Микропартикуле показују фибринолитичку и протеолитичку активност. Недавне студије су показале да МП могу да обезбеде каталитичку површину за конверзију плазминогена у плазмин експресијом активатора плазминогена типа урокиназе (*urokinase-type plasminogen activator* (uPA)) и његовог рецептора (uPAR), чиме обезбеђују профибринолитичку улогу. МП које настају од активираних ендотелних ћелија обезбеђују каталитичку површину за паракрину генерацију плазмина (90).

Стандардизација у детекцији МП као и њихова потенцијална улога прогностичког параметра, могла би бити корисна у циљу стратификације ризика као и предвиђања исхода болести и процена ризика за настанак различитих патолошких процеса.

1.4. Хемостазни систем

Активација коагулационог система на месту повреде крвног суда доводи до стварања тромбина и конверзије фибриногена у фибрин који формира фибрински угрушак и спречава губитак крви из оштећеног крвног суда. Ако је коагулациони систем неадекватно или превише активиран, депозиција фибрина може се јавити и у интактним крвним судовима, доводећи до тромбозе. Насупрот томе, фибринолитички систем има способност да разгради фибринску мрежу било да је формирана током нормалне хемостазе или у процесу тромбозе (91).

1.4.1. Коагулација

1.4.1.1. Тромбин

Ткивни фактор је главни иницијатор стварања тромбина у процесу инфламације. Инфламаторни медијатори као што су Ц – реактивни протеин, активација комплемента, TNF α и IL-6 могу бити окидач за синтезу ткивног фактора (16). У физиолошким условима, експресија ТФ је ограничена на екстраваскуларне ћелије међутим, проинфламаторни стимулуси су способни да индукују експресију ТФ на моноцитима и ендотелним ћелијама (92). ТФ повећава инфламацију повећањем интраваскуларног депозита фибрина и формирањем проинфламаторних фрагмената фибрина као и генерисањем коагулационих протеаза, укључујући фактор VIIa, фактор Ха и тромбин, који активирају рецепторе активирани протеазама (89).

Блокирање активности ткивног фактора може у потпуности да блокира активацију коагулације изазвану инфламацијом. Ткивни фактор се везује за фактор VIIa, након чега тако настали комплекс катализује конверзију фактора X до Ха, који заједно са фактором Va формира комплекс, протромбин (фактор II) који са калцијумом генерише настанак тромбина (фактор IIa). Једна од главних улога тромбина је превођење фибриногена у фибрин (93). Једном активирани тромбин додатно активира тромбоците који даље утичу на коагулацију и имају улогу у настанку микропартикула. Даљим везивањем ткивног фактора, тромбина или других активираних коагулационих протеаза за специфичне протеаза активирани рецептори на инфламаторним ћелијама, утиче се на процес инфламације, доводећи до ослобађања инфламаторних цитокина, који ће даље последично утицати на процесе коагулације и фибринолизе (93).

Генерисање тромбина је кључни процес у коагулацији који одређује степен хемостазе или тромботичког процеса (94).

1.4.1.2. Фибрин

Као што је претходно поменуто, једна од главних улога тромбина јесте превозивање фибриногена у фибрин. Фибриноген је гликопротеин, величине 340kDa са различитим местима за везивање која су, или изложена на самом молекулу, или постају доступна након специфичних структурних промена. Коришћењем ових места за везивање, фибриноген и његови деривати могу да комуницирају са више различитих протеина и ћелијских рецептора у плазми. Овакве интеракције неопходне су за нормалну функцију фибриногена и утичу на процесе као што је формирање фибриноског угрушка или фибринолиза, као и на друге процесе као што је инфламација (95).

Фибриноген садржи више домена за везивање других молекула и састоји се од два сета $\text{A}\alpha$ -, $\text{B}\beta$ - и γ ланаца са вишеструким интер- и интра-дисулфидним мостовима. Представља молекул који има много потенцијалних места за везивање за друге молекуле, која су делимично изложена за везивање без било каквих конформација молекула фибриногена. Остала места су маскирана и постају доступна током конверзије фибриногена у фибрин. Синтезише се на добро контролисан начин како би се омогућило добијање довољне количине фибриногена за адекватну хемостазу, као и повећање нивоа фибриногена као одговор на различите стимулусе. Базалне вредности фибриногена варирају, при чему се сматра да је 50% варијација детерминисано генетским факторима (96).

Фибриноген и фибрин могу директно стимулирати експресију проинфламаторних цитокина (као што су $\text{TNF}\alpha$ и IL-1) на моноклеарним ћелијама и довести до продукције хемокина од стране ендотелних ћелија и фибробласта (93).

Фибриноген носи више адхезивних секвенци за препознавање леукоцитних интегрина. Када се посматра функција фибрина (фибриногена) у запаљенским процесима, леукоцитни интегрин $\alpha\text{M}\beta 2$ (Mac-1) је од највећег значаја. Везује се високим афинитетом за секвенце на γA ланцу (96). Интеракција између фибриногена и леукоцитног интегрин $\alpha\text{M}\beta 2$ је од великог значаја за развој РА (97).

1.4.2. Природни антикоагуланси

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

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

У физиолошким условима, *протеин Ц* се активира тромбином у присуству тромбомодулина као кофактора (93). Тромбомодулин (ТМ) је молекул који је кључни активатор антикоагулантних и антифибринолитичких путева, на чију експресију утиче инфламација. Представља мембрански протеин тип 1 који се налази на ендотелним ћелијама. Након везивања за ТМ, тромбин губи прокоагулантну активност и постаје активатор система протеина Ц, када особине тромбина од прокоагулантних постају антикоагулантне. До губитка прокоагулантних својстава тромбина долази услед везивања тромбомодулина за функционално важна места тромбина при чему блокира интеракције са другим протеинима који везују тромбин (98). Показано је да различити инфламаторни цитокини као и васкуларне повреде смањују експресију ТМ на ендотелним ћелијама, што доводи до повећања укупног прокоагулантног ефекта (96). Везивање тромбомодулина не само да доводи до приближно 100 пута веће активације протеина Ц, већ и блокира конверзију фибриногена у фибрин посредовану тромбином и инхибира везивање тромбина за ћелијске рецепторе на тромбоцитима и инфламаторним ћелијама и на тај начин показује значајну антиинфламаторну активност (93).

1.4.3. Фибринолиза

Акутни фибринолитички одговор на инфламацију јесте ослобађање активатора плазминогена, ткивног активатора плазминогена (*tissue-type plasminogen activator* (t-PA)) и урокиназног активатора плазминогена (*urokinase-type plasminogen activator* (u-PA)) са места у ендотелним ћелијама у којима се складиште (93).

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

Комплекс тромбина и ТМ резултује убрзаном активацијом инхибитора фибринолизе (*thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (ТАFI)) (99). Активација коагулационог система доводи до формирања тромбина и истовремено, активацијом ТАFI, штити се формирани угрушак од преурађене фибринолизе. Постало је познато да ТАFI систем представља везу између коагулационе и фибринолитичке каскаде и омогућава синхронизацију ова два система (100). ТАFI, познат још и као карбоксипептидаза Б (*Thrombin-activatable plasma carboxypeptidase B* (СРВ)), настаје у јетри као зимоген (проСРВ) а детектован је и у тромбоцитима (101). Поред тога, мегакариоцити могу синтетисати ТАFI због чега је присутан интрацелуларно у тромбоцитима у концентрацији око 50ng на 1×10^9 тромбоцита (102). Активација карбоксипептидазе Б се дешава током тромботичких догађаја, уклањањем такозваног активационог пептида на N-крају проСРВ. Иако тромбин и плазмин могу да активирају проСРВ *in vitro*, цепањем активационог пептида, кофактор тромбина тромбомодулин, убрзава активацију карбоксипептидазе Б приближно 1000 пута формирањем тромбин/тромбомодулин комплекса, који се сматра физиолошким активатором проСРВ (101). Уклањањем С-краја резидуе лизина, изложеноу на делимично разграђеном фибрину, карбоксипептидаза Б смањује везивање плазминогена и ткивног активатора плазминогена за фибрин, сузбијајући везивање фибринолитичког ензима плазмينا (103). Неколико проинфламаторних медијатора као што су С5а, остеопонтин и брадикинин су препознати као супстрати карбоксипептидазе Б *in vitro*. Цепањем фибринског лизина и спречавањем фибринолизе, карбоксипептидаза Б може имати прокоагулациону и проинфламаторну улогу. Смањењем активности проинфламаторних медијатора, С5а, остеопонтин и брадикинина, карбоксипептидаза Б може имати антинфламаторну улогу (101).

Показано је да концентрација ТАFI може да корелира са концентрацијом реактаната акутне фазе као што је Ц-реактивни протеин, указујући да експресија гена ТАFI може бити под утицајем инфламаторних стимулуса као што су цитокини и глукокортикоидни хормони (99). Велики број студија указује на улогу ТАFI у инфламацији и активацији ћелија али нема података о могућој улози у стварању микропартикула (104).

1.4.5. Коагулациони систем и инфламација. Реуматоидни артритис

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

Инфламација и коагулација представљају повезане процесе који могу значајно утицати један на други. Ова интеракција се јавља на више нивоа као што су активација тромбоцита, формирање фибрина као и на нивоу физиолошких антикоагулационих путева. Инфламација мења тромботички одговор повећавајући прокоагулансе и смањујући антикоагулансе и фибринолизу. Међутим, *инфламација не само да доводи до активације коагулације, већ и коагулација значајно утиче на активацију инфламације*. Активација коагулације и депозиција фибрина, као последица инфламације, може се сматрати суштинским делом одбране домаћина против, на пример, инфективних агенаса, како би се зауставила даља инвазија агенаса и последични инфламаторни одговор ограничио на одређено подручје. Међутим, претерани или недовољно контролисани одговор, може довести до ситуације у којој коагулација и тромбоза доприносе болести као што је формирање тромба на руптурираном атеросклеротичном плаку уз присуство великог броја инфламаторних ћелија. Овакво стање за последицу има развој акутних артеријских тромботичних догађаја, акутног инфаркта миокарда или нестабилне ангине пекторис (93).

Фактори коагулације као што је тромбин или антикоагулантни протеини као што је активирани протеин Ц, могу активирати специфичне ћелијске рецепторе на моноклеарним или ендотелним ћелијама, што може утицати на продукцију цитокина или на апоптозу инфламаторних ћелија (93). Инфламаторни цитокини доводе до различитих протромботичких стања као што су ендотелна дисфункција, експресија ткивног фактора и активација коагулације, инхибиција фибринолизе и протеина Ц. Други важни медијатори који доводе до хиперкоагулабилности узроковане инфламацијом су микропартикуле, тромбоцити, неутрофили, тромбин и фибриноген, α_1 – антитрипсин, фактор XII и каликреин – кинин систем (105).

Тромбоцити имају важну улогу у патогенези тромбозе изазване инфламацијом, посебно у стањима акутне артеријске тромбозе, или руптуре атеросклеротског плака као што је код акутног коронарног синдрома. Ерозијом интима крвог суда и изложеношћу субендотелног колагена, долази до адхезије тромбоцита и активације. Тромбоцити могу бити активирани директно преко проинфламаторних медијатора.

Формирањем тромбина долази до активације других тромбоцита и процес се наставља. Поред овога, активација тромбоцита може убрзати формирање фибрина и другим механизмима. Експресија П-селектина на мембрани тромбоцита не само да доводи до везивања тромбоцита за леукоците и ендотелне ћелије већ и повећава експресију ткивног фактора на моноцитима (93).

Хронична системска инфламација у РА мења хемостатске механизме у корист тромбозе, активацијом коагулационог система, инхибицијом фибринолизе и смањењем физиолошких антикоагулационих путева (105). Као што је раније поменуто, инфламација и коагулација су повезани процеси при чему се интеракција између ова два система одвија на неколико нивоа, као што су активација тромбоцита, стварање фибрина као и на нивоу физиолошких антикоагулационих путева. Инфламација мења тромботички одговор повећавајући прокоагулансе и смањујући антикоагулансе (93). Тако, присуство протромботичких стања делују синергистички са традиционалним факторима ризика и доприносе повећаном кардиоваскуларном ризику (15). Међутим, повезаност са традиционалним факторима ризика за настанак кардиоваскуларних болести не објашњава у потпуности прерану атеросклерозу код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса (14, 16).

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

1.5. Оксидациони стрес

Два ентитета која учествују у патофизиологији готово свих болести јесу оксидациони стрес и инфламација. У хомеостатским и физиолошким условима, реактивне кисеоничне врсте у малим количинама имају улогу у ћелијској и митохондријалној сигнализацији и функционалности. Међутим, уколико дође до пораста концентрације, реактивне кисеоничне врсте могу посредовати оштећењу ћелија и ткива које последично доводи до запаљења и оксидационог стреса (106). Оксидациони стрес је динамичан феномен који представља неравнотежу између прооксидационих и антиоксидационих параметара у корист прооксиданата и у патогенези болести укључен је на сложен начин (107).

1.5.1. Слободни радикали

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

Хемијска једињења као што су водоник пероксид (H_2O_2) и пероксинитит јон ($ONOO^-$), представљају нерадикалске компоненте, немају неспарене електроне али се понашају као слободни радикали и помажу реакције слободних радикала (108).

Слободни радикали су молекули, атоми или јони, који садрже један или више неспарених електрона и као такви су способни за самостално постојање. Најједноставнији слободни радикал је атом водоника с обзиром на чињеницу да има само један неспарени електрон. Хомолитичка фисија је један од начина настанка слободних радикала, при чему слободни радикали настају додатком једног електрона нерадикалу, нпр. када дође до раскидања ковалентне везе и по један електрон из ковалентне везе остаје на сваком атому. Пример хомолитичке фисије је када цепањем молекула воде настаје хидроген радикал (H^\bullet) и хидроксил радикал (OH^\bullet) (109).

Слободни радикали могу настати на више начина:

1. *Ендогено*: физиолошки, као нуспроизвод митохондријалног транспортног ланца током ћелијског дисања, услед инфламаторних процеса, исхемије/реперфузије и хроничних болести као што су карцином, атеросклероза;
2. *Егзогено*: Излагањем спољашњим загађењима, УВ зрачењу, употребом цигарета, метаболизмом ксенобиотика.

Слободни радикали се деле у више категорија у зависности од тога који атом је у центру: реактивне врсте кисеоника (*reactive oxygen species* (ROS)); реактивне врсте азота (*reactive nitrogen species* (RNS)); реактивне врсте угљеника (*reactive carbon species* (RCS)) и реактивне врсте сумпора (*reactive sulfur species* (RSS)) (Табела 2) (108).

Табела 2. Слободни радикали, врсте и подела

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

1.5.2. Антиоксидациони систем заштите

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

- 1) *Примарни*: чине га ензими који разграђују слободне радикале: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD), глутатион-пероксидаза (GPx), глутатион редуктаза (GR) и неензимске компоненте као што су глутатион (GSH), аскорбинска киселина, β -каротен, α -токоферол (108, 110, 111);
- 2) *Секундарни*: обухвата специфичне оксидоредуктазе као што су тиолне-трансферазе, протеин-АДП-рибозилтрансферазе, АТФ и Ca_2^+ независне трансферазе, пигменте (као што је мелатонин) и неке стабилне липидне молекуле (ЛДЛ) (108);
- 3) *Терцијарни*: обухвата протеине који везују прелазне метале (церулоплазмин који везује бакар као и апоферитин који везује гвожђе) (108, 110).

1.5.3. Улога оксидационог стреса у реуматоидном артритису

У последњих неколико година, примећено је да су оксидациони стрес и смањена антиоксидациона заштита главне карактеристике пацијената оболелих од реуматоидног артритиса (107). Као одговор на запаљење у РА, прекомерна продукција реактивних кисеоничних врста се обично генерише из ендогеног извора као што је митохондријални ланац транспорта електрона, процесом оксидативне фосфорилације. Кисеоничне врсте у РА имају различито порекло и могу настати активирањем макрофага у синовијалној мембрани, хондроцитима, али и путем активираних неутрофила у синовијалној шупљини (112). Реакција производње реактивних кисеоничних врста праћена је повећаном регулацијом различитих ензима као што су NADPH оксидаза, NO синтаза као и ксантин оксидаза (113). Након тога, комплекс NADPH оксидазе катализира редукцију кисеоника до супероксид анјон радикала. Осим уколико концентрација ове реактивне кисеоничне врсте није неутралисана супероксид дисмутазом, она последично доводи до смртоносне комбинације са азот-моноксидом, синтезе токсичног пероксинитрита. Компоненте хрскавице и екстрацелуларног матрикса оштећене су или директно или индиректно супероксидним анјон радикалом, заједно са другим кисеоничним и азотним врстама, смањујући синтезу компоненти

матрикса као што су колаген и протеоглигани (114). Осим тога, H_2O_2 -зависна инхибиција синтезе протеогликана доприноси оштећењу хрскавице у РА услед интеракције са механизмима обнављања протеолитичких и оксидационих оштећења (115).

Повећане вредности реактивних кисеоничних врста потенцијално су штетне за различите макромолекуле и могу довести до погоршања физиолошких процеса и оштећења ћелијских мембрана, липида, протеина и нуклеинских киселина. Ово доводи до брзог протоновања - смањења -SH група, деаминације ДНК база и липидне пероксидације (116). Поред тога, пероксидација липида укључена је у патогенезу многих болести као што су карцином, дегенеративне и инфламаторне болести. Пероксидација липида може се мерити као TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) и игра важну улогу у свим наведеним процесима (117). Повећана пероксидација липида пријављена је у различитим биолошким узорцима болесника са реуматоидним артритисом (118). Поред тога, није изненађујуће да је смањена биорасположивост азот-моноксида и смањена активност ендотелне азот-моксид синтазе, удружена са продукцијом реактивних кисеоничних врста, што представља добро познати механизам који доводи до ендотелне дисфункције (68).

Људски организам је развио систем антиоксидационе заштите у циљу превенције ефеката прооксиданаса и заштите ћелија од оксидационог оштећења. Ензими укључени у неутрализацију и елиминацију реактивних кисеоничних врста су супероксид дисмутаза (SOD), глутатион-пероксидаза (GSH-Px) и каталаза (CAT) као и глутатион редуктаза (GR), глутатион-С-трансфераза (GST), тиоредоксин редуктаза (TR) и хем оксигеназа (114). Каталаза и редуковани глутатион имају афинитет за H_2O_2 . Афинитет каталазе расте услед повећаних вредности H_2O_2 (119) док супероксид дисмутаза има главни ефекат у неутрализацији супероксид анион радикала (114).

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

II

ЦИЉ

ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

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

Општи циљеви:

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

Специфични циљеви:

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

ХИПОТЕЗЕ

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

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1. Испитаници

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

1. Контролна група – здрави испитаници ($n = 42$)
 - a. Контролна група – жене у пременопаузи ($n=14$)
 - b. Контролна група – жене у менопаузи ($n=34$)
2. Експериментална група – пацијенти са дијагностикованим реуматоидним артритисом ($n = 48$)
 - a. Експериментална група – жене у пременопаузи ($n=11$)
 - b. Експериментална група – жене у менопаузи ($n=31$).

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

3.1.1. Контролна група

Критеријуми за укључивање/искључивање из студије су следећи:

а. Критеријуми за укључивање:

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

б. Критеријуми за искључивање:

- акутна или хронична инфекција;
- претходне хоспитализације због цереброваскуларних, кардиоваскуларних поремећаја и венског тромбоемболизма у претходних годину дана;
- трансфузија крви и крвних деривата;
- дијабетес (било који тип);
- карцином било које локализације и стадијума;
- инсуфицијенција јетре;

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

Следећи критеријуми за искључивање засновани су на лабораторијским анализама:

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

3.1.2. Експериментална група

а. Критеријуми за укључивање:

- особе женског пола којима је дијагностикован реуматоидни артритис пре више од 5 година;
- старости између 40 и 65 година;
- особе које су у могућности и вољне да дају писани информисани пристанак и да поштују све захтеве протокола;
- имају постављену дијагнозу РА који је наступио у одраслом добу како је дефинисано критеријумима класификације за РА Америчког колеџа за реуматологију (АЦР)/Европске лиге против реуматизма (ЕУЛАР) из 2010. године (120)
- имају средњу активност болести на основу индекса активности болести DAS28 (*Disease Activity Score-28*). Средња активност болести се дефинише као вредност DAS28 већа од 2,6 а мања од 5,1;
- примале су метотрексат током најмање 12 недеља непосредно пре узимања крви, од чега је потребно да су најмање 8 недеља пре рандомизације примали стабилну дозу између 15 и 25 мг недељно;

- примају терапију са адекватном и стабилном дозом фолне киселине (не мање од 5 мг недељно);
- у својој терапију имају стабилну дозу од ≤ 10 мг дневно преднизона током 6 недеља;
- нису користили нестероидне антиинфламаторне лекове 3 дана пре вађења крви (више од 5 времена полуелиминације).

в. Критеријуми за искључивање:

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

Следећи критеријуми за искључивање засновани су на лабораторијским анализама:

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

3.2. Анамнестички подаци

Након верификације присуства/одсуства реуматоидног артритиса, а пре узимања узорка крви, забележени су анамнестички подаци о сваком учеснику истраживања. Том приликом, од пацијената су узети подаци о пушењу, менопаузи, медицинска историја и медикаментозна терапија. Сва питања која су постављена пацијентима наведена су у табели (Табела 3 и 4).

Табела 3. Анамнестички подаци узети приликом узорковања крви.

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

За пацијенткиње са РА додатна питања су била:

Табела 4. Додатни анамнестички подаци за пацијенте са РА.

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

3.3. Методе клиничке процене активности болести

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

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

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

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

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

2. **Број болних зглобова (ББЗ)** – налаз укупног броја болних зглобова утврђеним лекарским прегледом, од укупно 28 зглобова који се прате.
3. **Број отечених зглобова (БОЗ)** – налаз укупног броја отечених зглобова утврђеним лекарским прегледом, од укупно 28 зглобова који се прате.
4. **Визуелно-аналогна скала (pVAS)** – пацијентова свеукупна процена болести — представља пацијентову процену утицаја РА на његово свеукупно стање, одговарајући на питање: "Узимајући у обзир свеобухватни утицај РА на Вас, како се осећате данас?". Оцена је на скали од 0-100mm, при чему вредност 0mm значи веома добро док 100mm значи веома лоше (121-123).

Табела 5. Процена активности болести на основу вредности DAS28 (124).

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

3.3.2. Метода процене функционалног статуса пацијената са РА

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

За сваку од ових категорија, пацијенту је понуђено да одговори са колико тешкоћа их обавља, од 0-3 (0-без тешкоћа, 3-са много тешкоћа). За валидну процену функционалног статуса потребно је да се одговори минимално на 6/8 одељака. Збир појединачних оцена, подељен са 20, уз подешавање према евентуалној употреби ортопедског помагала, даје HAQ – DI збир. Мањи збир означава бољи функционални статус (125).

3.4. Методе лабораторијских испитивања

3.4.1. Узорковање крви

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

3.4.2. Методе обраде узорака крви

3.4.2.1. Обрада узорака крви за одређивање врсте и концентрације микропартикула

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

3.4.2.2. Обрада узорака крви за одређивање глобалних метода хемостазе

За одређивање глобалних метода хемостазе, ендогеног тромбин потенцијала (ETP – *Endogenous thrombin potential*), укупног хемостатског потенцијала (OHP – *Overall Haemostasis Potential*), укупног коагулационог потенцијала (OCP – *Overall Coagulation Potential*) и укупног потенцијала фибринолизе (OFP – *Overall Fibrinolysis Potential*), приликом узорковања крви, користили смо вакутајнер са цитратним пуфером (3,2% натријум-цитрат; 109 mmol/L). Након узимања крви, узорци су остављени на собној температури највише сат времена, након чега су центрифугирани на 2000 g 15 минута на собној температури, плазма је издвојена и аликвотирана (500µl) а затим замрзнута на -80°C до почетка експеримента.

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

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

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

Параметри оксидационог стреса и антиоксидационе заштите одређивани су у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу.

3.4.3. Методе одређивања биохемијских параметара

Приликом узорковања крви испитаницима је узета крв за извођење биохемијских анализа. Коришћен је вакутајнер који не садржи пуфер и игла 21G. Биохемијске анализе за све учеснике истраживања одређиване су у Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу. У табели су наведени сви одређивани биохемијски параметри (Табела 6).

Табела 6. Биохемијски параметри и методе одређивања.

Параметар	Метода и апарат за анализу
Седиментација (mm/h)	<i>Westergren</i> метода, Vacuette ESR analyzer
Ц-реактивни протеин (mg/L)	Турбидиметријска метода, Beckman Coulter AU680 analyzer
Глукоза (mmol/L)	Хексокиназни метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Уреа (mmol/L)	Ензимски метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Креатинин (umol/L)	Модификована <i>Jaffe</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Мокраћна киселина (umol/L)	Модификована <i>Fossati</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680

Укупни билирубин (umol/L)	Модификација класичне диазо методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Директни билирубин (umol/L)	Варијанта класичне методе <i>Van den Bergh</i> и <i>Mueller</i> , биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Феритин (ug/L)	Турбидиметријска метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Укупни протеини (g/L)	Модификација биуретске методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Албумин (g/L)	Колориметријска метода бром-крезол зелено, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Глобулини (g/L)	Израчунавају се из разлике укупних протеина и албумина, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Холестерол (mmol/L)	колориметријска ензимска метода – комбинација естеразе и оксидазе у један ензимски реагенс, Beckman Coulter AU680 analyzer
Триглицериди (mmol/L)	процедура се заснива на низу повезаних ензимских реакција; Beckman Coulter AU680 analyzer
ХДЛ (mmol/L)	колориметријска ензимска метода, Beckman Coulter AU680 analyzer;
ЛДЛ (mmol/L)	is calculated by FF (total cholesterol (TC) minus high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol minus triglycerides (TGs)/5 in mg/dl)
Индекс атеросклерозе	ЛДЛ/ХДЛ
Однос (Холестерол/ХДЛ)	Холестерол/ХДЛ
АСТ (IU/L)	IFCC метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
АЛТ (IU/L)	IFCC метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Гама-ГТ (IU/L)	Модификована <i>Szasz</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Алкална фосфатаза (U/L)	IFCC метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Лактат-дехидрогеназа (U/L)	Модификована <i>Wacker</i> метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Креатин-киназа (U/L)	Модификована IFCC метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Креатин киназа МБ (U/L)	Модификована IFCC метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Гвожђе (umol/L)	Варијанта <i>Schade</i> методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
УИБЦ (umol/L)	Колориметријска метода, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
ТИБЦ (umol/L)	Израчунава се као збир <i>Fe</i> и УИБЦ, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
ТСАТ (%)	<i>Fe</i> /ТИБЦ изражено у процентима, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Калијум (mmol/L)	Јон-селективне електроде <i>ISE</i> метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Натријум (mmol/L)	Јон-селективне електроде <i>ISE</i> метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Хлориди (mmol/L)	Јон-селективне електроде <i>ISE</i> метод, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Калцијум (mmol/L)	Колориметријска метода – <i>Arsenazo III</i> , биохемијски

	анализатор Beckman Coulter AU680
Фосфор (mmol/L)	Колориметријска метода – модификација <i>Daly</i> и <i>Ertingshausen</i> методе, биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680
Магнезијум (mmol/L)	Колориметријска метода – <i>xylydyl blue</i> , биохемијски анализатор Beckman Coulter AU680

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

3.4.4. Методе одређивања хематолошких параметара

Поред биохемијских параметара свим пацијентима одређиване су вредности хематолошких параметара, комплетна крвна слика са леукоцитарном формулом. Коришћен је вакутајнер са ЕДТА пуфером и игла 21G. Хематолошке анализе за све учеснике истраживања одређиване су у Хематолошкој лабораторији Интерне клинике Клиничког центра у Крагујевцу. У табели су наведени сви одређивани хематолошки параметри (Табела 7).

Табела 7. Хематолошки параметри и методе одређивања.

Параметар	Метода и апарат за анализу
Леукоцити ($10^9/L$)	Бројање крвних ћелија је вршено на хематолошком бројачу Beckman Coulter LH780 који ради на принципу регистравања и мерења промена у електричном отпору који стварају крвне ћелије суспендоване у проводљивом раствору пролазећи кроз пукотину одређеног промера
Неутрофили (%)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Лимфоцити (%)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Моноцити (%)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Еозинофили (%)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Базофили (%)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Неутрофили (#) ($10^9/L$)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Лимфоцити (#) ($10^9/L$)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Моноцити (#) ($10^9/L$)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Еозинофили (#) ($10^9/L$)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Базофили (#) ($10^9/L$)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Еритроцити ($10^{12}/L$)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
Хемоглобин (g/L)	Цијанметхемоглобинска метода, Beckman Coulter LH780

Хематокрит (L/L)	MCV(fl) x број еритроцита (10^{12})
MCV (fL)	Средњи волумен еритроцита, Beckman Coulter LH780
MCH (pg)	Средњи садржај хемоглобина у еритроциту конц. хемоглобина (g/L) / број еритроцита (10^{12})
MCHC (g/L)	Средња концентрација хемоглобина у еритроциту конц. хемоглобин(g/L)/хематокритна вредност
RDW	Коефицијент варијације дистрибуције волумена еритроцита, Beckman Coulter LH780
Тромбоцити ($10^9/L$)	Метода бројања ћелија и апарат за анализу исти као код леукоцита
MPV (fL)	Средњи волумен тромбоцита, Beckman Coulter LH780
PCT	Волумен крви који заузимају тромбоцити, Beckman Coulter LH780
PDW	Коефицијент варијације дистрибуције волумена тромбоцита, Beckman Coulter LH780

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

3.4.5. Методе процене серопозитивности/серонегативности

У циљу процене серопозитивности/серонегативности пацијента са дијагностикованим РА, у Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу, спроведене су следеће лабораторијске анализе (Табела 8).

Табела 8. Параметри за праћене серопозитивности/серонегативности пацијента.

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

АСРА/anti-CCP – *Anti-citrullinated protein/peptide antibodies* – антитела на циклични цитрулисани пептид

3.4.6. Методе одређивања параметара хемостазе

У истраживању су спроведени *општи тестови* као и *глобалне методе хемостазе* у циљу праћења коагулације и фибринолизе у наведеним популацијама. Општи тестови хемостазе спроведени су у Централној лабораторији Клиничког центра

у Крагујевцу док су глобалне методе хемостазе спроведене на Каролинска Институту у Шведској.

3.4.7. Општи тестови хемостазе

Приликом узорковања крви, испитаницима је узета крв за одређивање параметара хемостазе. Коришћен је вакутајнер са цитратним пуфером (3,2% натријум-цитрат; 109 mmol/L) и игла 21G. Параметри хемостазе за све учеснике истраживања одређивани су у Централној лабораторији Клиничког центра у Крагујевцу. У табели су наведени хемостатски параметри који су одређивани у овом истраживању (Табела 9).

Табела 9. Општи параметри хемостазе

Параметар	Метода и апарат за анализу
Фибриноген	<i>Clauss</i> метода, ACL TOP analyzer by Instrumentation Laboratory
APTT (сек)	Време потребно да се формира стабилан угрушак се бележи у секундама и представља АРТТ. Заснива се на принципу да се у цитратној плазми, додатком супституента тромбоцита, фактора XII и CaCl ₂ доводи до формирања стабилног угрушка; ACL TOP300 Instrumentation Laboratory
PT	Мерење времена потребног за формирање угрушка плазме пацијента коришћењем Ca –тромбопластина, Апарат – ACL TOP300 Instrumentation Laboratory
INR	Протромбинско време узорка (сек) / протромбинско време (сек) стандардне плазме
PT (%)	Процент % промене PT у односу на здравог пацијента (сведока); референтне вредности 70-120% (11,1сек).

АРТТ – активирано парцијално тромбопластинско време; **PT** – протромбинско време; **INR** – интернационални нормализовани однос.

3.4.8. Метода клиничке процене коштане густине

Минерална густина костију је одређена DXA техником (двоенергетском апсорпциометријом X зрацима) лумбалног дела кичме (L1-L4) и проксималног дела фемура. За процену је коришћен апарат *Hologic Discovery A densitometer (Hologic, Bedford, MA, USA)*, на одељењу за реуматологију, Клиничког центра у Крагујевцу. Код жена у менопаузи, праћен је T скор. Остеопороза заснована на остеодензитометрији дефинисана је као вредност T скорa $\leq -2,5$; остеопенија T скором између $-1,0$ и $-2,5$; без обољења уколико су вредности једнаке или веће од $-1,0$. Код жена које нису у менопаузи праћен је Z скор. Скала којим су дефинисане нормалне вредности, остепороза и остеопенија исте су као и за T скор.

3.5. Глобалне методе хемостазе

3.5.1. Ендогени тромбин потенцијал

Праћење вредности тромбина кроз ЕТР есеј (ендогени тромбин потенцијал) (само за истраживачке сврхе; *Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany*), одређивано је колорифотометријски на *BCS® XP System* апарату (Слика 1), према упутству произвођача (Siemens).



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

Innovance ETP тест кит садржи ЕТР реагенс (инхибитор агрегације фибрина, хромогени супстрат, соли и стабилизатор), ЕТР пуфер (Tris-HCl 0,05 М, рН 7,4) и калцијум хлорид (0,25 М). Рок трајања ЕТР тест кита износи 12 сати на собној температури, 48 сати у фрижидеру или 4 недеље у замрзивачу (-20 °С) а може се одмрзнути једном у воденом купатилу максимално 5 минута на 37 °С и користити у року од 8 сати. *Dade Innovin* реагенс садржи лиофилизоване реагенсе, између осталог, рекомбинантни хумани ТФ и тромбопластин. *Aktin FS (AFS)* садржи фосфолипиде соје и зеца са активном елагинском киселином.

ЕТР се одређује кинетиком трансформације синтетског тромбинског супстрата, који се мери као испорука хромофора у узорку плазме на таласној дужини 405 nm. Формирање тромбина у узорку се активира ЕТР реагенсом и калцијум хлоридом. Кинетика конверзије супстрата се мери са *BCS® XP* апаратом (Слика 1). За

исправљање активности $\alpha 2$ -макроглобулина везаног за тромбин, користи се математички алгоритам.

Из криве настанка тромбина (График 1), одређивано је 4 параметра:

1. **ETP** – мерење укупног ендогеног тромбин потенцијала односно генерисаног тромбина;
2. **t_{lag}** – време од додавања окидача коагулације до почетка стварања тромбина;
3. **C_{max}** – максимална концентрација тромбина;
4. **t_{max}** – време када је постигнута максимална концентрација тромбина.

Вредности ETP израчунате су као површина испод криве (AUC) стварања тромбина и представљена је у процентима (%). Вредности C_{max} представљене су такође у процентима (%), док се вредности t_{lag} и t_{max} представљају у секундама (сек).

Коефицијенти варијације интра- и интер-есеја за нормалну плазму били су 1,06 % и 1,74 %, док су вредности за хипокоагулабилну биле 1,82 % и 3,92 % (126). Мерни опсег за ETP параметар износи 20-800 mA (0-200%) док је за c-max параметар 20-800 mA/min, (0-200%). Референтни интервали су одређени на основу узорака 30 здравих испитаника и износе за ETP параметар: 349,4 - 515,6 mA (87 - 128%) и c-max параметар: 112 - 163,6 mA/min (82 - 119%).

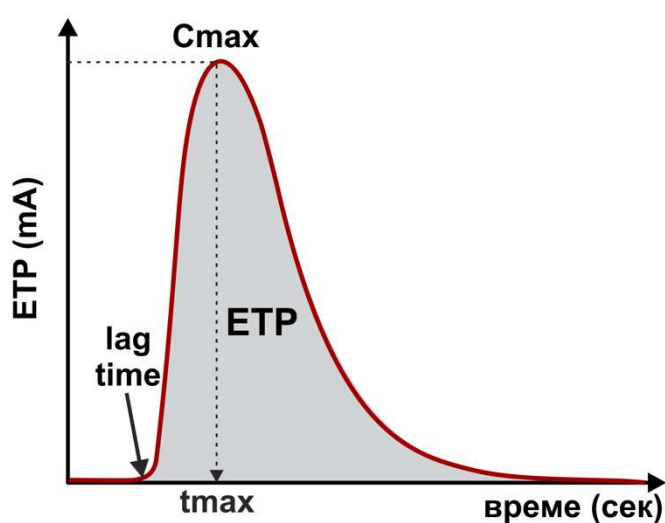


График 1. Крива настанка тромбина. Ендогени тромбин потенцијал

3.5.2. Укупни хемостатски потенцијал

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

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

Када се формира крива агрегације фибрина, фибриноген се каталитичком реакцијом посредованом генерисаним тромбином постепено преводи у фибрин. Са друге стране, услед додавања *t-PA*, плазминоген је активиран да производи плазмин, који последично разграђује фибрин. Као резултат, свака вредност апсорбанце представља ниво фибрина у одређеном времену. Површина испод криве представља равнотежу између генерисања и протеолизе фибрина, кроз период мерења нивоа фибрина.

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

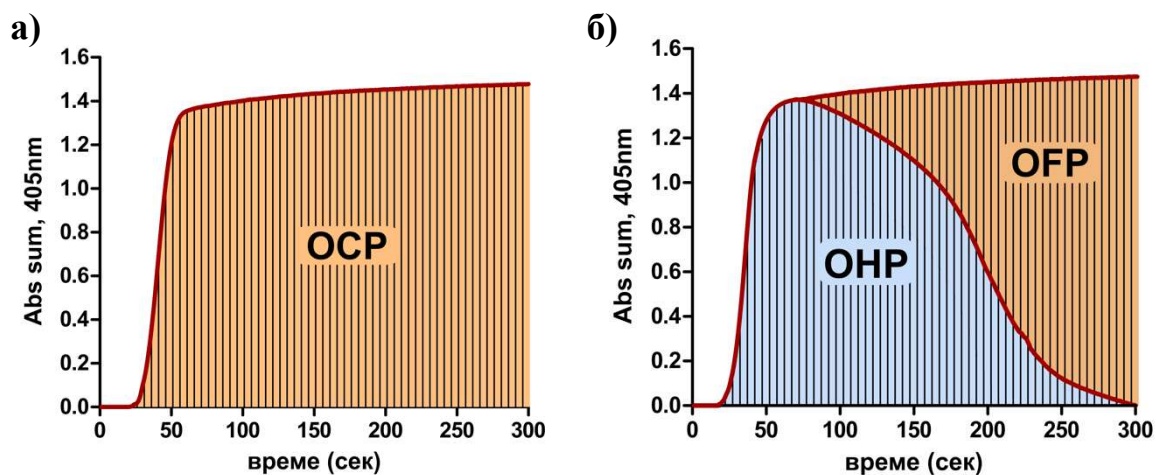
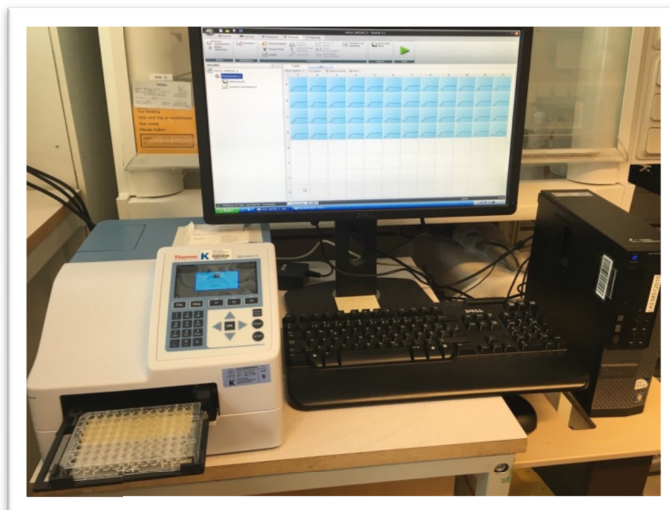


График 2. Криве коагулације и фибринолизе: а) ОСП – укупни коагулациони потенцијал; б) ОНР – укупни хемостатски потенцијал и ОФР – укупни фибринолитички потенцијал.

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

Пре почетка експеримента, крв се одмрзава на воденом купатилу на температури 37°C у трајању од 5-7 минута. Тест се изводи на микротитарској плочи (*Immulon-IB; Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA*) у коју се додаје 20µL фосфолипидног реагенса, који садржи синтетички фосфатидилсерин, фосфатидилхолин и сфингомијелин (*Rossix, Mölndal, Sweden; 0,11 mmol/l*), разблаженог са tris-HCl пуфером (pH = 7,5; 66mmol/L TRIS; 130mmol/L NaCl; 4M HCl) у односу 1:1 (конц. 0,25mmol/L). Након тога додаје се 140µL плазме, док се као контрола користи пулована нормална плазма (PNP – *pooled normal plasma*). Припреми се тромбин (конц. 10U/ml) и t-PA (конц. 0,1mg/ml). Од направљених раствора тромбина и t-PA добијају се два финална пуфера: (1) тромбин (конц. 0,04U/ml) и t-PA (300ng/ml), додавањем претходно направљеног раствора (tris-HCl пуфер и 1mol/l CaCl₂) (конц. 34mmol/L). Апсорбанца се читава на 405 nm, сат времена, на сваких 12 секунди, при чему се конструише крива агрегације фибрина. Вредност се читава спектрофотометријски на елиза читачу *Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Scientific* приказаном на слици 2. Површина испод криве се израчунава као сума свих вредности апсорбанце (Abs-sum) (127).



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

Тромбоцитни реагенс (*Unicorn Diagnostics Ltd, London, UK*) који представља лиофилизовани препарат тромбоцитне мембране, се реконституише у 3ml дестиловане воде. Број фосфолипида тромбоцитне мембране је пропорционалан броју тромбоцита $70 \times 10^6 / \text{ml}$ док садржај ткивног фактора износи 40 pg/ml. Реконституисани реагенс се чува на температури од -70°C у малим запреминама. Радни пуфери се спремају *ex tempore*. *Tris* пуферу (66 mmol/l *Tris* + 130 mmol/l NaCl, pH 7,5 прилагођен са 4 mol/l HCl) се додаје калцијум хлорид (коначна концентрација 35 mmol/l). *Tris* пуфер I се прави додавањем говеђег тромбина (коначна концентрација 0,1 IU/ml) и ткивног активатора плазминогена (коначна концентрација 862 ng/ml). *Tris* пуфер II се добија додавањем говеђег тромбина (коначна концентрација 0,1 IU/ml). Први се користи за одређивање ОНР-а док се други користи за одређивање ОСР-а.

Интра- и интер-есеј коефицијенти варијације за ОНР есеј износе 8,6% и 5,2%, редом. Распон нормалних вредности за параметар ОНР износи 4,24-14,49, за ОСР од 6,79 до 20,03 док је за OFP параметар 16,5-52%.

За израчунавање параметара се користи Microsoft Excel програм.

3.5.3. Време фибринолизе угрушка

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

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

Δ CLT представља разлику времена фибринолизе угрушка, добијено одузимањем вредности времена фибринолизе пре и након додатка инхибитора фибринолизе, PTCI. На овај начин меримо TAFI активност (параметар који инхибира фибринолизу). Када блокирамо активност TAFI додатком PTCI, долази до ослобађања фибринолизе, брже лизе угрушка и скраћивања времена фибринолизе угрушка (График 3) (127).

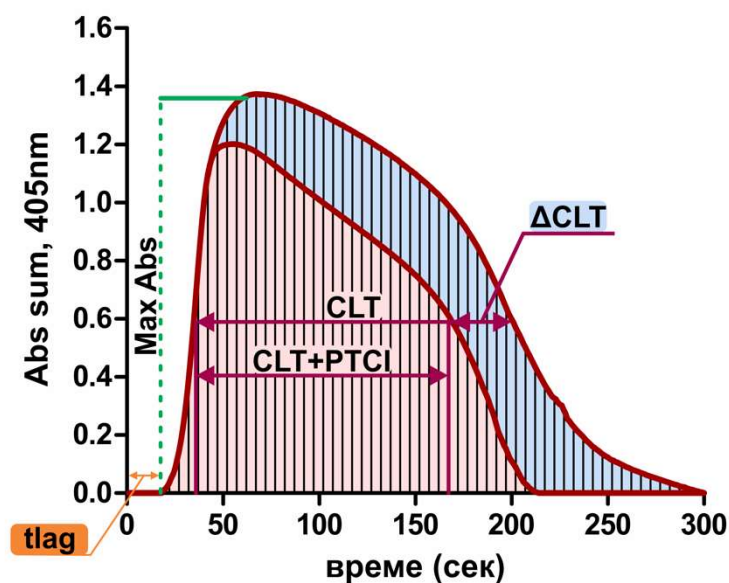


График 3. Крива агрегације фибрина. CLT – време фибринолизе угрушка; PTCI – *potato tuber carboxypeptidase inhibitor* – инхибитор карбоанхидразе; Δ CLT – разлика између времена лизе угрушка пре и након додавања PTCI.

3.5.4. Методе анализе турбидиметријских података (анализа формирања угрушака)

Релативни баланс између формирања угрушка и фибринолизе, сматра се да указује на тромботски потенцијал након васкуларне повреде. Развој кардиоваскуларних болести је повезан са тромботичком компонентом, иницираном васкуларним оштећењем. Код оклузивне артеријске болести, развој тромба богатог тромбоцитима подржан је фибринском мрежом, при чему формирање фибрина зависи од сложених интеракција између компоненти коагулационе каскаде. Густина фибринског угрушка као и стопа фибринске полимеризације и деградације, се може одредити помоћу турбидиметријских и деградационих есеја.

Параметри који се могу одредити из турбидиметријског есеја јесу (128):

- 1) **lag time**: представља време током којег се формира довољно протофибрила за детекцију и латералну агрегацију. Узета је као време од почетка реакције до временске тачке у којој је дошло до експоненцијалног повећања апсорбанце;
- 2) **MaxAbs** – максимална апсорбанца представља повећање вредности апсорбанце од почетних до максималних вредности;
- 3) **Slope** (нагиб): најстрмији део криве агрегације фибрина; показује бочну агрегацију и фазу формирања влакана;
- 4) **Lag Abs Avrg** – просечна вредност апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до *lag time* (времена када се формира довољно протофибрила за детекцију);
- 5) **Max Abs-Lag Abs** – апсорбанца која се добија одузимањем вредности *MaxAbs* (максималне апсорбанце) и *Lag Abs Avrg* (просечне вредности апсорбанце од почетка стварања криве коагулације до *lag time*);
- 6) **Max Abs time** – време када се постиже максимална апсорбанца;
- 7) **Slope time** – време које се добија одузимањем *Max Abs time* (време када се постиже максимална апсорбанца) и *lag time* (време када се формира довољно протофибрила за детекцију).

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

Параметри се добијају коришћењем Microsoft Excel програма.

3.6. Електронска микроскопија

Угрушци за електронску микроскопију су припремљени на следећи начин. Након испитивања глобалних хемостатских метода, угрушци који су формиран након ОНР методе, испрани су раствором PBS (*phosphate-buffered saline*), фосфатним пуфером, и фиксирани у 2,5% глутаралдехиду 60 минута на собној температури, након чега су чувани на 4°C. Пре почетка експеримента, узорци су испрани у дестилованој води и остављени у 70% етанолу током 10 минута, 95% етанолу 10 минута, чистом етанолу 15 минута на собној температури и чистом ацетону 10 минута и након тога пребачени су у тетраметилсилан 10 минута и сушени на ваздуху. Након сушења, узорци су монтирани на алуминијумском стубу и премазани угљеником (*Bal-Tec MED 010, Lichtenstein*). Узорци су анализирани на електронском микроскопу (*Ultra 55 field emission scanning electron microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany*) на 3 kV (129).

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

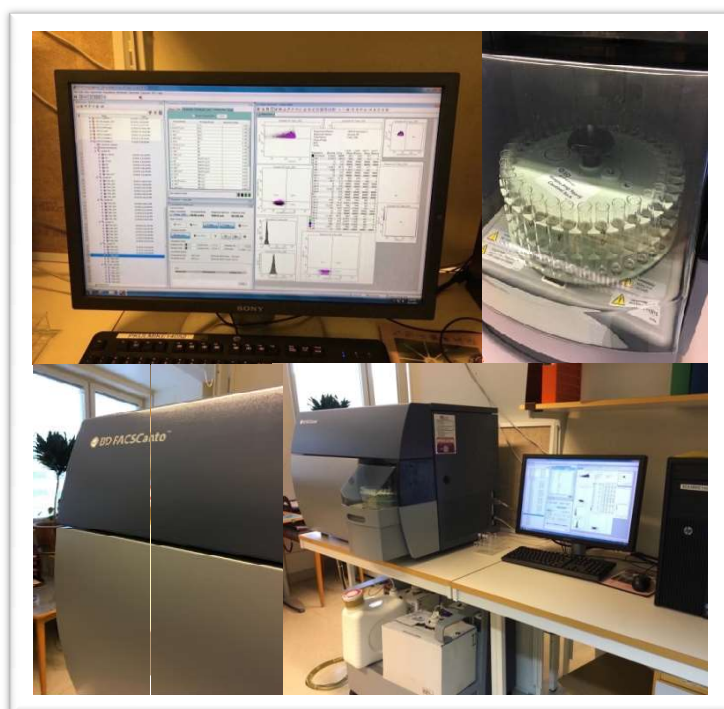
3.7. Методе одређивање микропартикула

Претходно замрзнута плазма сиромашна тромбоцитима, одмрзава се у воденом купатилу 5 минута на (37°C) након чега се центрифугира на 2000 g 20 минута на собној температури. Након тога, одваја се супернатант који се рецентрифугира на 13 000 g 2 минута на собној температури. Супернатант добијен након другог центрифугирања, коришћен је за анализу. Укупна запремина од 20µl узорка се инкубира са 5µl одговарајућих антитела, 30 минута у мраку (71). На укупном броју од 40 доступних узорака, спроведена је анализа одређивања концентрације различитих врста микропартикула.

3.7.1. Концентрација микропартикула

3.7.1.1. Одређивање укупне концентрације микропартикула

Укупна концентрација МП одређена је као број догађаја позитивних на фосфатидилсерин. Као контрола коришћен је тритон. Прво је постављен опсег за МП позитивне на фосфатидилсерин, након чега је исти опсег коришћен за одређивање концентрације МП у контролној и експерименталној групи (71).



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

3.7.2. Врста микропартикула

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

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

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

Изотопске контроле (**IgG1-FITC**, **IgG1-PE**, **IgG1-APC**) без реактивности на хумане антигене, коришћене су као негативна контрола за дефинисање позадинске буке приликом цитометријске анализе. Као контрола коришћен је детерцент тритон X-100, нејонски сурфактант, дериват полиетилен-гликола. Циљ коришћења тритона био је да се уклоне све МП присутне у узорку, како би се добијене вредности поредиле са концентрацијом МП у контролној и експерименталној групи.

3.7.3. Одређивање концентрације појединачних микропартикула

Концентрација МП одређивана је на основу граница постављених у тритон групи. Прво је одређен праг (“*gate*”) којим су обухваћене све МП које постоје у узорку. Вредности најниже границе за све врсте МП постављене су пре почетка извођења експеримента. Границе су одређиване на основу *Megamix-Plus SSC beads* (*BioCytex, Marseille, France*), који се користи за постављање граница приликом одређивања МП а који је компатибилан са апаратом коришћеним за одређивање МП. Овај *Megamix-Plus SSC beads* садржи честице различитих дијаметара 0,5 μm , 0,9 μm и 3,0 μm (Фигура 4).

Вредности доње границе прерачунате су на основу формуле а на основу вредности добијених употребом *Megamix-Plus SSC beads*-а. Како бисмо имали исте услове за све узорке, на основу средњих вредности добијених на овом формулом, одређено је да доња граница буде 3400. Вредности горње границе добијене су дистрибуцијом SSC параметра и као вредност узета је највећа вредност добијена *Megamix-Plus SSC beads*-ом (Фигура 4б). Та вредност износила је 8×10^4 . Наведене

вредности коришћене су за све узорке у свим групама. Унутар постављених граница, налазиле су се МП које смо пратили (График 4).

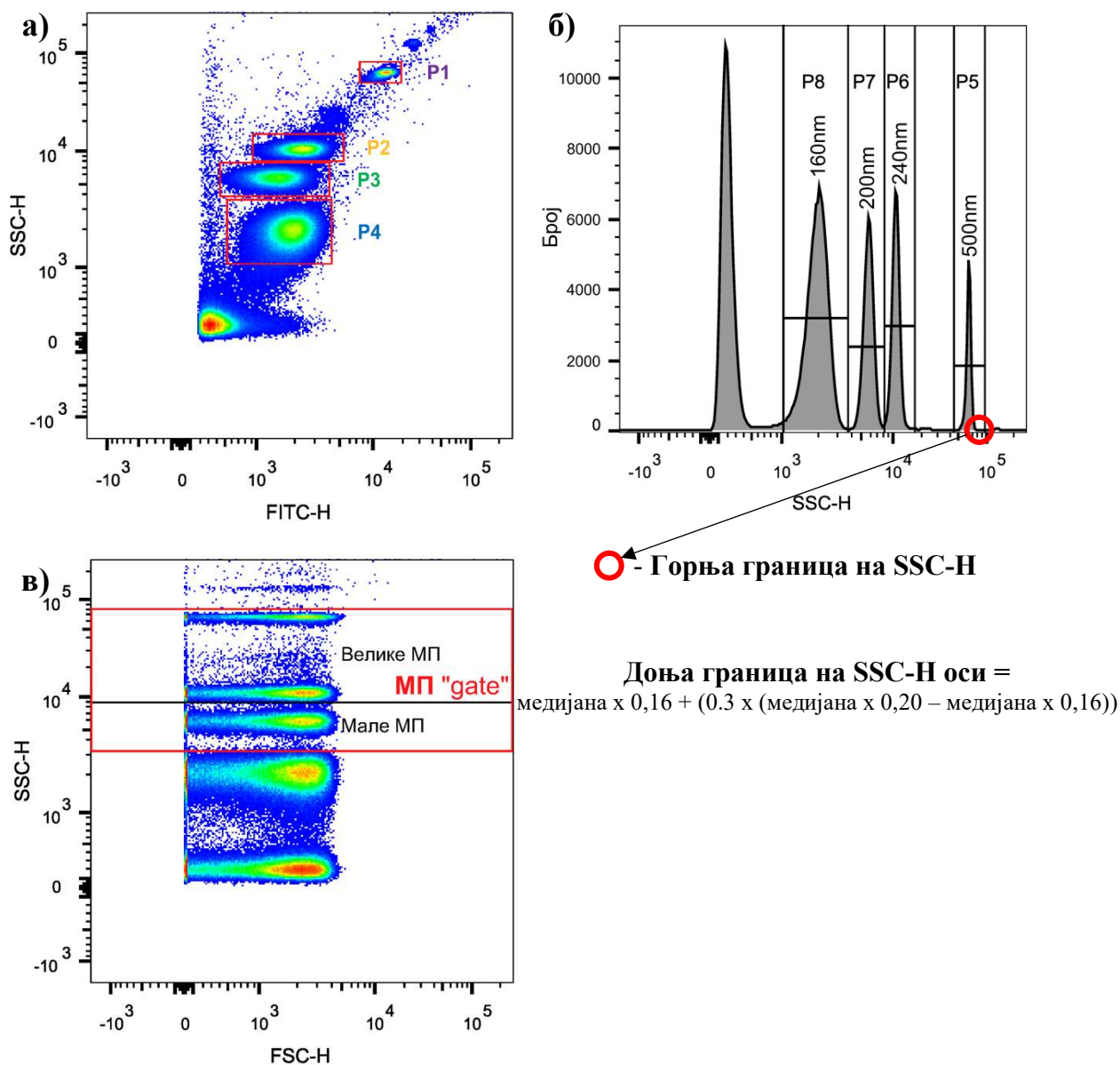
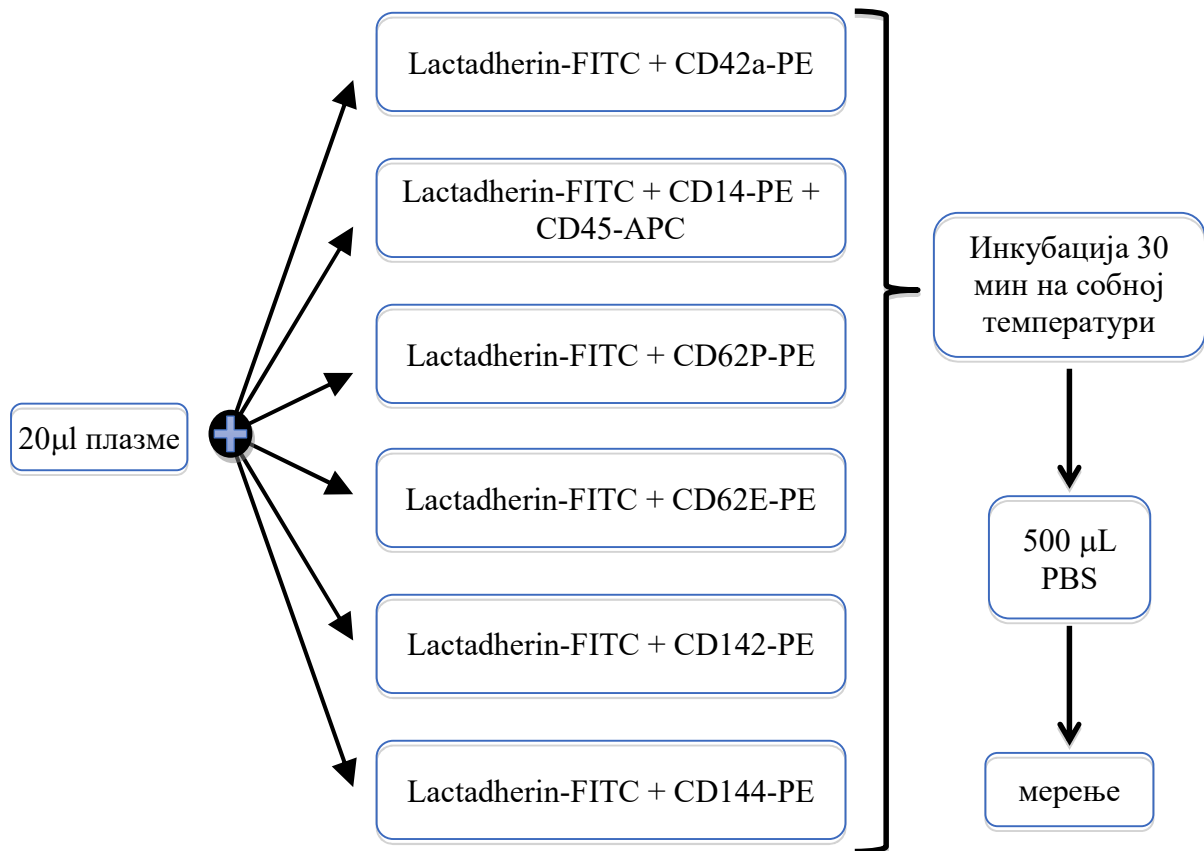


График 4. Одређивање опсега микропартикула. а) - Подешавања FITC и SSC волтажа. P1: 0,5 μm честице; P2: 0,24 μm честице; P3: 0,2 μm честице; P4: 0,16 μm честице; б) Распореда перлица у SSC параметру; в) Постављање МП опега ("gate").

Након постављања граница за све МП које се налазе у узорку, постављене су границе за сваку појединачну врсту МП, које су одређиване у студији. Као доња и горња граница коришћене су претходно одређене вредности. Опсег је прво постављен у тритон групи за одређену врсту МП а затим је исти коришћен је унутар једне врсте МП, како бисмо обезбедили исте услове у свим испитиваним узорцима. Поступак је

поновљен за сваку врсту одређиваних МП. Протокол одређивања микропартикула и комбинације антитела приказане су на слици 4.



Слика 4. Протокол и комбинација антитела коришћених у истраживању.

3.8. Методе одређивања параметара редокс статуса

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

3.8.1. Методе одређивања параметара оксидационог стреса

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

3.8.2. Супстанце и реагенси за одређивање параметара оксидационог статуса

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

3.8.2.1. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације одређиван је индиректном методом, а базирано на стварању реактивних продуката при реакцији са тиобарбитуратном киселином (енг. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*; **TBARS**) (130). Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

Реагенси

2-тиобарбитурна киселина (ТВА, $C_4H_4N_2O_2S$), $M_r=144,15$; натријум хидроксид (NaOH) $M_r=40,00$.

Поступак

Екстракт се добија комбиновањем $400 \mu l$ 28% трихлорсирћетне киселине (ТСА) и $800 \mu l$ плазме, затим се 15 минута оставља на лед, након чега се 15 минута врши

центрифугирање на 6000 грм. У 800 μl супернатанта додаје се 200 μl 1% тиобарбитурне киселине, а потом се добијени узорци кувају у воденом купатилу 15 минута на 100°C. Након наведене инкубације узорци се прилагођавају собној температури. Поступак за слепу пробу је исти, само се уместо плазме користи дестилована вода. Мери се спектрофотометријски на таласној дужини од 530 nm.

Концентрација ослобођених TBARS добијана је на основу следеће једначине:

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

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

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

3.8.2.2. Одређивање водоник пероксида (H_2O_2)

Концентрација H_2O_2 се одређује након оксидације фенол црвеног коју у присуству H_2O_2 катализује ензим пероксидаза из рена (енгл. *Horse Radish Peroxidase HRPO*). Добијено једињење се спектофотометријски одређује на таласној дужини $\lambda=610\text{nm}$ (131).

Реагенси

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

Поступак

У епрувете (90) пипетира се 200 μL плазме и 800 μL непосредно направљеног раствора фенол црвеног (енгл. *Phenol Red Solution-PRS*) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH=7), 5.5 mM D+ глукозе и 0.28mM фенол црвеног. Потом се додаје 10 μL (1:20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци су остављани на

собној температури 10 минута, а затим се подеси рН ≈ 12 , помоћу 1 М NaOH. Као слепа проба, уместо плазме, коришћена је дестилована вода.

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

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

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

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

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

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

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

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

3.8.2.3. Одређивање супероксид анјон радикала (O_2^-)

Приликом одређивања концентрације O_2^- коришћена је особина O_2^- да се у реакцији са нитро тетразолијум плавим (енгл. *Nitro Tetrazolium Blue* – **NTB**) ствара нитроформаза плаво (132). Мерење се спроводило на таласној дужини максималне апсорпције $\lambda_{max}=550nm$.

Реагенси

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

Поступак

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

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

Концентрација ослобођеног O_2^- добијена је на основу следећих једначина

$$\begin{aligned}\Delta E_u &= E_{2u} - E_{1u} \text{ (за узорак)} \\ \Delta E_{sp} &= E_{2sp} - E_{1sp} \text{ (за слепу пробу)} \\ \Delta E &= \Delta E_u - \Delta E_{sp} \\ \text{nmol } O_2^- / \text{ml узорка} &= \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05\end{aligned}$$

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

$$\text{nmol } O_2^- / \text{минут/g} = \Delta E / 0.015 \times 1 / 0.05 \times CF / m_{срца}$$

3.8.2.4. Одређивање нитрита (NO_2^-)

Количина ослобођеног NO_2^- у плазми се процењује индиректним методом – одређивањем нитрита захваљујући чињеници да се NO у реакцији са кисеоником претвара у нитрит у еквимоларном односу (133). Одређивање нитрита је доступно за разлику од директног мерења NO .

Реагенси

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

Поступак

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

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

У епрувете (90) је пипетирано 0,2 ml узорка плазме, 0,1 ml PCA (3N) и 0,4 ml 20 mM EDTA. Након 10-15 минута на леду и центрифугирањем на 600rpm у трајању од 15 минута, одлије се супернатант и у талог дода 220 μl K_2CO_3 . У 200 μl добијеног естракта плазме се додаје 250 μl свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 μl амонијачног пуфера (pH=9,0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH_4Cl) и натријум тетраборат ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса.

Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређивана је на основу калибрационе криве. Калибрациона крива је конструисана на основу екстинкција узорка, који су у себи садржале познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добијана је пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO₂ у 1 ml слепе пробе и то: 3, 6, 12, 24 μl, чиме је добијена концентрација нитрита од: 2.18, 4.37, 8.73 и 17.34 nmol NO₂⁻/ml. Након стабилизације боје на собној температури 5-10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од λ=550 nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита добијана је на основу:

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

$$\frac{\text{Екстинкција стандарда} - \text{екстинкција слепе пробе}}{\text{Концентрација NaNO}_2 \text{ у стандарду}}$$

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

Дељењем разлике екстинкција узорка и слепе пробе са стандардом F:

$$\text{nmol NO}_2/\text{ml узорка} = \Delta E (E_u - E_{sp})/F.$$

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

$$\text{nmol NO}_2/\text{минут/g wt} = \Delta E/F \times CF \text{ (коронарни проток)}/m_{\text{срца}}$$

3.8.3. Методе одређивања параметара антиоксидационог система заштите

Изоловани еритроцити за одређивање параметара антиоксидативне заштите је припремљен према *McCord* и *Fridovich* садржи око 50 g Hb/l (134). Из лизата крви су одређивани параметари антиоксидационог система заштите: каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD) и редуковани глутатион (GSH). Активност каталазе и супероксид дисмутазе изражена је у U/gHb $\times 10^3$, док је ниво глутатион редуктазе изражен као nmol/ml RBCs.

3.8.4. Супстанце и реагенси за одређивање параметара антиоксидационе заштите

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

3.8.4.1. Одређивање каталазе (CAT)

У лизату крви одређивана је концентрација каталазе према *Beutler*-овој методи (135). Метода се заснива на спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на таласној дужини од 230 nm при којој H₂O₂ апсорбује светлост.

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

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

Након тога, добијена концентрација се разблажује до 10 mM.

Поступак

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

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

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

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

3.8.4.2. Супероксид дисмутаза (SOD)

Одређивање активности супероксид дисмутазе засновано је на епинефринској методи (136). Мерење се спроводи спектрофотометријски на таласној дужини од 480nm, на којој се детектује брзина аутооксидације. Ова метода припада методи ”негативног” типа јер прати смањење брзине аутооксидације у алкалној средини које зависи од супероксид анјон радикала. Као слепа проба уместо лизата крви коришћена је дестилована вода.

Поступак

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

Активност SOD се изражава у јединицама њене активности по граму Hb (unit/gHb) (137). Израчунавање се спроводи према наведеној реакцији:

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

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

3.8.4.3. Одређивање редукованог глутатиона (GSH)

Метода одређивања редукованог глутатиона заснива се на реакцији оксидације глутатиона са 5,5-дитиобис-6,2-нитробензоичном киселином, методом по *Beutler*-у (138). Ниво редукованог глутатиона одређиван је спектрофотометријски на таласној дужини од 420 nm. Као слепа проба уместо лизата крви коришћена је дестилована вода.

Поступак

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

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

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

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

3.8.5. Статистичка обрада података

Статистичка обрада експерименталних података је спроведена на следећи начин:

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

IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

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

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

У трећем делу резултата, приказане су врсте и концентрације микропартикула код свих испитаника.

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

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

У шестом делу приказани су значајне корелације праћених параметара.

4.1. Карактеристике испитаника

4.1.1. Демографске карактеристике испитаника

У истраживање је укључено 48 здравих контрола женског пола и 42 пацијента женског пола, са дијагностикованим РА. Између контролне групе и пацијената са РА није постојала значајна разлика у погледу традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика као што су пушење, 41,7% према 40,5%, и индекса телесне масе, $26,13 \pm 3,90 \text{ kg/m}^2$ према $26,16 \pm 4,87 \text{ kg/m}^2$. Није постојала разлика између у старости између здравих испитаника и пацијената ($54,15 \pm 6,29$ година према $54,81 \pm 9,05$ година) нити у броју непушача (41,7% према 45,2%) и бивших пушача (16,6% према 14,3%). Демографске карактеристике испитиваних група приказане су у табели 10а.

Табела 10а. Демографске карактеристике испитаника

Карактеристике испитаника	Контрола	РА
Број испитаника	48	42
Старост (године)	$54,15 \pm 6,29$	$54,81 \pm 9,05$
Индекс телесне масе (kg/m^2)	$26,13 \pm 3,90$	$26,16 \pm 4,87$
Менопауза (Да/Не)	34/14	31/11
Пушење (n, %)		
Да	20 (41,7%)	17 (40,5%)
Не	20 (41,7%)	19 (45,2%)
Бивши пушач	8 (16,6%)	6 (14,3%)
Остеодензитометрија (n, %)		
Нормалан налаз	25 (52,1%)	7 (16,7%)
Остеопенија	18 (37,5%)	29 (69,0%)
Остеопороза	5 (10,4%)	6 (14,3%)

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

4.1.1.1. Активност реуматоидног артритиса

Средња дужина трајања болести код пацијената била је $12,8 \pm 8,0$ година, док је активност болести, мерена параметром DAS28, била средња до висока, са средњом вредношћу $3,8 \pm 1,1$, у тренутку узорковања крви, при чему је од укупног броја пацијената 9 (20%) било у ремисији ($\text{DAS28} < 2,5$). Сви пацијенти су лечени стандардним протоколом, применом метотрексата у дози 15–25 mg недељно и

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

Функционални статус пацијената, праћен HAQ упитником, износио је $1,26 \pm 0,24$, док је пацијентова свеукупна процена болести износила $60,12 \pm 14,32$ mm. Већина пацијената била је позитивана на реума фактор ($n = 36$; 86%) и цитрулинска антитела ($n = 40$; 95%). Од укупног броја, 5 пацијената је имало екстра-артикуларне манифестације у форми реуматоидних чворова на лактовима и малим зглобовима шака. Сви праћени параметри функционалног статуса, активности болести и клиничког стања пацијената приказани су у табели 10б.

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

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

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

4.1.2. Демографске карактеристике испитаника на основу менопаузе

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

Табела 11а. Демографске карактеристике испитаника на основу менопаузе.

Карактеристике пацијената	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
Број испитаника	14	34	11	31
Старост (године)	$47,00 \pm 2,88^{a*,c*}$	$57,09 \pm 4,74^{d**}$	$43,64 \pm 6,22^{f**}$	$58,77 \pm 6,08$
Индекс телесне масе (kg/m^2)	$24,06 \pm 3,18^{a*,c*}$	$26,99 \pm 3,89^{d*}$	$23,59 \pm 4,66^{f*}$	$27,07 \pm 4,68$
Пушење (n,%)				
Да	7 (50%)	14 (41,2%)	5 (45,5%)	12 (38,75)
Не	6 (42,9%)	13 (38,2%)	6 (54,5%)	13 (41,9%)
Бивши пушач	1 (7,1%)	7 (20,6%)	/	6 (19,4%)
Остеодензитометрија (n, %)				
Нормалан налаз	10 (71,4%)	15 (44,1%)	4 (36,4%)	3 (9,7%)
Остеопенија	4 (28,6%)	14 (41,2%)	7 (63,6%)	22 (71,0%)
Остеопороза	/	5 (14,7%)	/	6 (19,3%)

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

4.1.2.1. Активност реуматоидног артритиса праћена на основу менопаузе

Просечна дужина трајања болести у пременопаузалној групи је $11,64 \pm 8,38$ година док је у менопаузалној групи та вредност износила $13,23 \pm 7,94$ година. Средња вредност активности болести мерена параметром DAS28 износила је $3,64 \pm 1,42$ код жена у пременопаузи (у ремисији је било 4 (36%) пацијенткиње), док је код жена у менопаузи вредност DAS28 била $3,79 \pm 0,97$ (у ремисији је било 5 (16%) пацијенткиња). Просечна стабилна доза метотрексата 12 недеља пре укључења

износила је $16,82 \pm 2,23$ mg/недељно у пременопаузалној и $18,01 \pm 2,92$ mg/недељно у менопаузалној групи.

Функционални статус пацијената, мерен упитником (HAQ), износио је $1,21 \pm 0,21$ у пременопаузалној групи према $1,27 \pm 0,26$ у менопаузалној групи док је пацијентова свеукупна процена болести износила $64,12 \pm 11,12$ mm у пременопаузалној и $61,72 \pm 13,82$ mm, без статистички значајних разлика. Сви пацијенти са екстрартикуларним променама су били у менопаузалној групи. Параметри функционалног статуса, активности болести и клиничког стања пацијената на основу менопаузе приказани су у табели 116.

Табела 116. Параметри за праћење функционалног статуса, активности болести и клиничког стања пацијената са РА на основу менопаузе

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

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

4.1.3. Придружене болести испитаника

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

Укупно 61 испитаник имао је коморбидитет, 29 у контролној групи и 32 у експерименталној. Најчешћи коморбидитет је артеријска хипертензија а најређи хронични панкреатитис, гастритис, глауком (по један пацијент). Учесталост свих коморбидитета у контролној и експерименталној групи приказана је у табели 12.

Табела 12. Учесталост коморбидитета у контролној и експерименталној групи

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

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

4.1.4. Придружене болести испитаника на основу менопаузе

На основу претходно утврђених и поменутих критеријума за укључивање/искључивање, наведен је укупан број као и врста коморбидитета у контролној и експерименталној групи (табела 12). У табели 13 наведена је врста коморбидитета, број и проценат по праћен на основу менопаузе.

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

Табела 13. Учесталост коморбидитета у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе.

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

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

4.2. Лабораторијске анализе

4.2.1. Утицај реуматоидног артритиса на биохемијске параметре

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

Вредности праћених биохемијских параметара као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 14.

Табела 14. Биохемијски параметри у контролној и експерименталној групи.

Биохемијски параметри	Контрола	РА
Седиментација (mm/h)	$13,33 \pm 8,83^{**}$	$22,95 \pm 13,50$
Ц-реактивни протеин (mg/L)	$2,54 \pm 2,40^{**}$	$11,55 \pm 26,42$
Глукоза (mmol/L)	$5,24 \pm 0,51$	$5,39 \pm 0,80$
Уреа (mmol/L)	$4,98 \pm 1,48$	$5,50 \pm 1,47$
Креатинин (umol/L)	$71,85 \pm 12,83$	$72,64 \pm 11,87$
Мокраћна киселина (umol/L)	$271,27 \pm 67,72$	$278,6 \pm 64,00$
Укупни билирубин (umol/L)	$10,36 \pm 3,43$	$10,53 \pm 3,23$
Директни билирубин (umol/L)	$1,59 \pm 0,59$	$1,79 \pm 0,64$
Феритин (ug/L)	$69,25 \pm 57,43$	$79,02 \pm 69,64$
Укупни протеини (g/L)	$71,85 \pm 4,58$	$71,31 \pm 5,01$
Албумин (g/L)	$43,63 \pm 2,26$	$42,21 \pm 2,50$
Глобулини (g/L)	$28,42 \pm 4,62$	$28,71 \pm 4,65$
Холестерол (mmol/L)	$6,50 \pm 1,23$	$6,06 \pm 1,01$
Триглицериди (mmol/L)	$1,5 \pm 0,65$	$1,49 \pm 0,62$
ХДЛ (mmol/L)	$1,60 \pm 0,30$	$1,49 \pm 0,29$
ЛДЛ (mmol/L)	$4,21 \pm 1,12$	$3,81 \pm 0,94$
Индекс атеросклерозе	$2,76 \pm 0,79$	$2,74 \pm 0,91$
Однос (Холестерол/ХДЛ)	$4,17 \pm 0,88$	$4,19 \pm 0,92$
АСТ (IU/L)	$22,96 \pm 4,69$	$22,21 \pm 6,39$

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

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

4.2.2. Утицај менопаузе на биохемијске параметре

У табели 15 представљени су биохемијски параметри посматрани на основу менопаузе. Статистички значајна разлика примећена је код неспецифичних параметара инфламације, при чему су вредности ових параметара значајно повишене код пацијената са РА у менопаузи као и пре менопаузе у поређењу са здравим женама у обе подгрупе. Исти тренд је примећен код оба неспецифична параметра инфламације, седиментације и Ц-реактивног протеина, у корист повећања параметра инфламације код пацијената са реуматоидном артритисом, односно значајно изнад горњих граница референтних вредности.

Посматрајући липидни профил, укупни холестерол се значајно разликовао између пременопаузалних контрола и контрола у менопаузи. Разлика је примећена и у групама између контрола у менопаузи и пременопаузалних пацијенткиња као и

пацијенткиња у пременопаузи и менопаузи. ХДЛ је значајно нижи код пременопаузалних пацијенткиња у односу на менопаузалне контроле, док вредности ЛДЛ-а показују повишене вредности у менопаузалној групи у односу на пременопаузалне контроле као и ниже вредности овог параметра код пацијенткиња у односу на менопаузалне контроле.

Вредности посматраних параметара као и статистички значајне разлике између подгрупа, приказане су у табели 15.

Табела 15. Биохемијски параметри у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу

Биохемијски параметри	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
Седиментација (mm/h)	11,21 ± 10,33 ^{b**, c**}	14,21 ± 8,13 ^{d*, e**}	25,35 ± 15,06	22,10 ± 13,06
Ц-реактивни протеин (mg/L)	1,84 ± 1,07 ^{b**, c**}	2,83 ± 2,73 ^{d**, e*}	25,28 ± 48,21	6,67 ± 9,22
Глукоза (mmol/L)	5,16 ± 0,35	5,27 ± 0,57	4,95 ± 0,54^{f*}	5,54 ± 0,83
Уреа (mmol/L)	4,36 ± 0,98^{c**}	5,24 ± 1,58	5,12 ± 1,13	5,64 ± 1,57
Креатинин (umol/L)	72,71 ± 10,55	71,50 ± 13,79	68,45 ± 11,51	74,13 ± 11,82
Мокраћна киселина (umol/L)	245,71 ± 34,75^{a*, c*}	281,79 ± 75,27	260,73 ± 54,19	284,94 ± 66,79
Укупни билирубин (umol/L)	9,78 ± 4,15	10,59 ± 3,13	8,55 ± 2,68^{f*}	11,13 ± 3,24
Директни билирубин (umol/L)	1,59 ± 0,75	1,59 ± 0,53^{e*}	1,39 ± 0,56^{f*}	1,94 ± 0,61
Феритин (ug/L)	19,64 ± 17,73^{a**, b**, c**}	89,68 ± 55,68^{d*}	65,36 ± 86,00^{f*}	83,87 ± 63,79
Укупни протеини (g/L)	72,29 ± 4,51	71,68 ± 4,67	72,82 ± 5,38	70,77 ± 4,86
Албумин (g/L)	43,21 ± 2,15	43,79 ± 2,3^{d*, e*}	41,82 ± 2,04	42,35 ± 2,67
Глобулини (g/L)	28,43 ± 4,24	28,41 ± 4,83	31,27 ± 5,16^{f*}	27,81 ± 4,17
Холестерол (mmol/L)	5,76 ± 1,03^{a**}	6,80 ± 1,19^{d**}	5,47 ± 0,87^{f*}	6,28 ± 0,98
Триглицериди (mmol/L)	1,39 ± 0,43	1,4 (0,7 – 3,9)	1,4 (0,7 – 3,3)	1,58 ± 0,69
ХДЛ (mmol/L)	1,63 ± 0,33	1,6 (1,2 – 2,5)^{d*}	1,3 (1,1 – 2,0)	1,53 ± 0,30
ЛДЛ (mmol/L)	3,49 ± 0,94^{a**}	4,51 ± 1,06^{d**, e*}	3,50 ± 0,83	3,92 ± 0,96
Индекс атеросклерозе	2,46 ± 0,93	2,89 ± 0,70	2,69 ± 0,67	2,76 ± 0,99
Однос (Холестерол/ХДЛ)	3,75 ± 0,81^{a*}	4,34 ± 0,86	4,03 ± 0,84	4,25 ± 0,95
АСТ (IU/L)	21,64 ± 4,53	23,5 ± 4,72	20,09 ± 5,22	22,97 ± 6,67
АЛТ (IU/L)	18,86 ± 7,95	20,15 ± 6,10^{d*}	16,18 ± 4,49	19,84 ± 14,74
Гама-ГТ (IU/L)	14,14 ± 5,60^{a*, b*, c*}	18,44 ± 6,57	26,45 ± 18,86	19,55 ± 7,90
Алкална фосфатаза (U/L)	60,43 ± 17,71^{a**}	75,59 ± 16,71	77,27 ± 29,14	72,84 ± 22,39
Лактат-дехидрогеназа (U/L)	330,71 ± 51,96^{a*, c*}	379,82 ± 79,15^{d*}	306,18 ± 105,45^{f*}	371 ± 62,89
Креатин-киназа (U/L)	78,86 ± 21,93	114,91 ± 88,85	102,45 ± 90,32	102,55 ± 55,83

Креатин киназа МБ (U/L)	10,00 ± 2,08^{a**, c*}	18,88 ± 38,13	14,64 ± 13,85	11,61 ± 2,50
Гвожђе (umol/L)	17,64 ± 12,34	16,82 ± 4,67 ^{d*}	12,20 ± 5,48	16,05 ± 6,80
УИБЦ (umol/L)	48,43 ± 14,79	42,26 ± 9,42	48,09 ± 11,26	42,35 ± 10,79
ТИБЦ (umol/L)	65,93 ± 8,77^{a**, c*}	59,35 ± 9,10	62,64 ± 10,28	59,19 ± 7,91
ТСАТ (%)	26,57 ± 17,64	29,29 (9,26)	23,73 ± 11,03	29,35 ± 11,37
Калијум (mmol/L)	4,52 ± 0,37	4,59 ± 0,33	4,47 ± 0,38	4,48 ± 0,36
Натријум (mmol/L)	138,00 ± 1,66	139,03 ± 2,49	137,91 ± 2,4	139,94 ± 2,11
Хлориди (mmol/L)	103,79 ± 1,12	103,44 ± 2,70	102,82 ± 1,66	103,48 ± 2,34
Калцијум (mmol/L)	2,36 ± 0,09	2,45 ± 0,11	2,35 ± 0,13	2,40 ± 0,08
Фосфор (mmol/L)	1,05 ± 0,13	1,06 ± 0,19	1,08 ± 0,10	1,13 ± 0,18
Магнезијум (mmol/L)	0,98 ± 0,25	0,94 ± 0,13	0,91 ± 0,11	0,88 ± 0,10

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. ХДЛ – липопротеини велике густине; ЛДЛ – липопротеини мале густине; АСТ – аспартат аминок-трансфераза; АЛТ – аланин аминок-трансфераза; Гама-ГТ – гама-глутамил-трансфераза; ТИБЦ – укупни капацитет везивања гвожђа; УИБЦ – резервни капацитет везивања гвожђа; ТСАТ – проценат сатурације трансферина гвожђем. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.3. Утицај реуматоидног артритиса на хематолошке параметре

4.2.3.1. Крвна слика

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

Вредности хематолошких параметара као и статистички значајна разлика између група приказане су у табели 16а.

Табела 16а. Вредности хематолошких параметара у контролној и експерименталној групи.

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

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

4.2.3.2. Леукоцитарна формула

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

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

Табела 166. Вредности параметара леукоцитарне формуле у контролној и експерименталној групи.

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

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

4.2.4. Утицај менопаузе на хематолошке параметре

4.2.4.1. Крвна слика

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

Вредности праћених параметара као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 17а.

Табела 17а. Вредности хематолошких параметара у контролној и експерименталној групи посматране на основу менопаузе.

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

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. **MCV** – просечни волумен еритроцита (*mean cell volume*); **MCH** – просечна количина хемоглобина у еритроциту (*mean hemoglobin concentration*); **MCHC** – просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита (*mean cell hemoglobin concentration*); **RDW** – мера варијабилности величине еритроцита (*red blood cell distribution width*); **MPV** – просечан волумен тромбоцита (*mean platelets volume*); **PCT** – запремински удео тромбоцита у јединици пуне крви (*plateletcrit*); **PDW** – расподела тромбоцита по волумену (*platelet distribution width*). Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.4.2. Леукоцитарна формула

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

Вредности праћених параметара леукоцитарне формуле као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 176.

Табела 176. Вредности параметара леукоцитарне формуле у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

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

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

4.2.5. Утицај реуматоидног артритиса на хемостатске параметре

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

Вредности хемостатских параметара као и статистички значајна разлика између група приказане су у табели 18.

Табела 18. Вредности хемостатских параметара у контролној и експерименталној групи.

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

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. АРТТ – активирано парцијално тромбoplastинско време; РТ – протромбинско време; INR – интернационални нормализовани однос; РТ (%) – проценат промене РТ у односу на здравог пацијента (сведока)-референтне вредности 70-120% (11,1сек). Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

- апсолутни број ћелија

4.2.6. Утицај менопаузе на хемостатске параметре

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

Вредности хемостатски параметара као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 19.

Табела 19. Вредности хемостатских параметара у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

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

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. АРТТ – активирано парцијално тромбопластинско време; РТ – протромбинско време; INR – интернационални нормализовани однос; РТ (%) – проценат промене РТ у односу на здравог пацијента (сведока)-референтне вредности 70-120% (11,1сек). Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b1 и 3; ^c1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.7. Параметри за одређивање серопозитивности/серонегативности

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

У табели 20 приказане су вредности за наведене параметре у целој групи оболелих од РА као и вредности праћене на основу менопаузе.

Табела 20. Вредности параметара за одређивање серопозитивности/серонегативности у целој РА групи и на основу менопаузе.

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

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. АСРА/anti-ССР – *Anti-citrullinated protein/peptide antibodies* – антитела на циклични цитрулисани пептид

4.3. Микропартикуле – врста и концентрација микропартикула

4.3.1. Укупна концентрација микропартикула

Вредности укупне концентрације МП значајно су се разликовале између све контролне и експерименталне групе.

Укупна концентрација МП била је статистички значајно мања у контролној групи у односу на пацијенте са РА ($p < 0,05$).

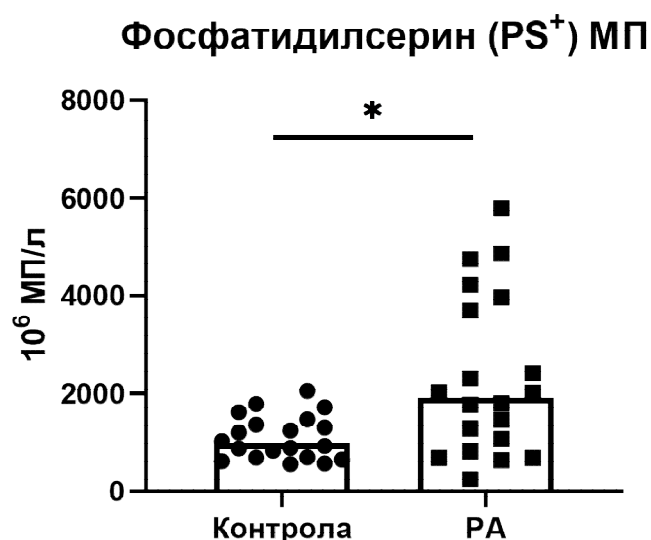


График 5. Укупна концентрација микропартикула (PS⁺) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 21. Укупна концентрација микропартикула (PS⁺) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10 ⁶)
Контрола	1071,50 (566,00 – 7036,00)	1411,00
РА	1918,50 (251,00 – 5796,00)	2330,28

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

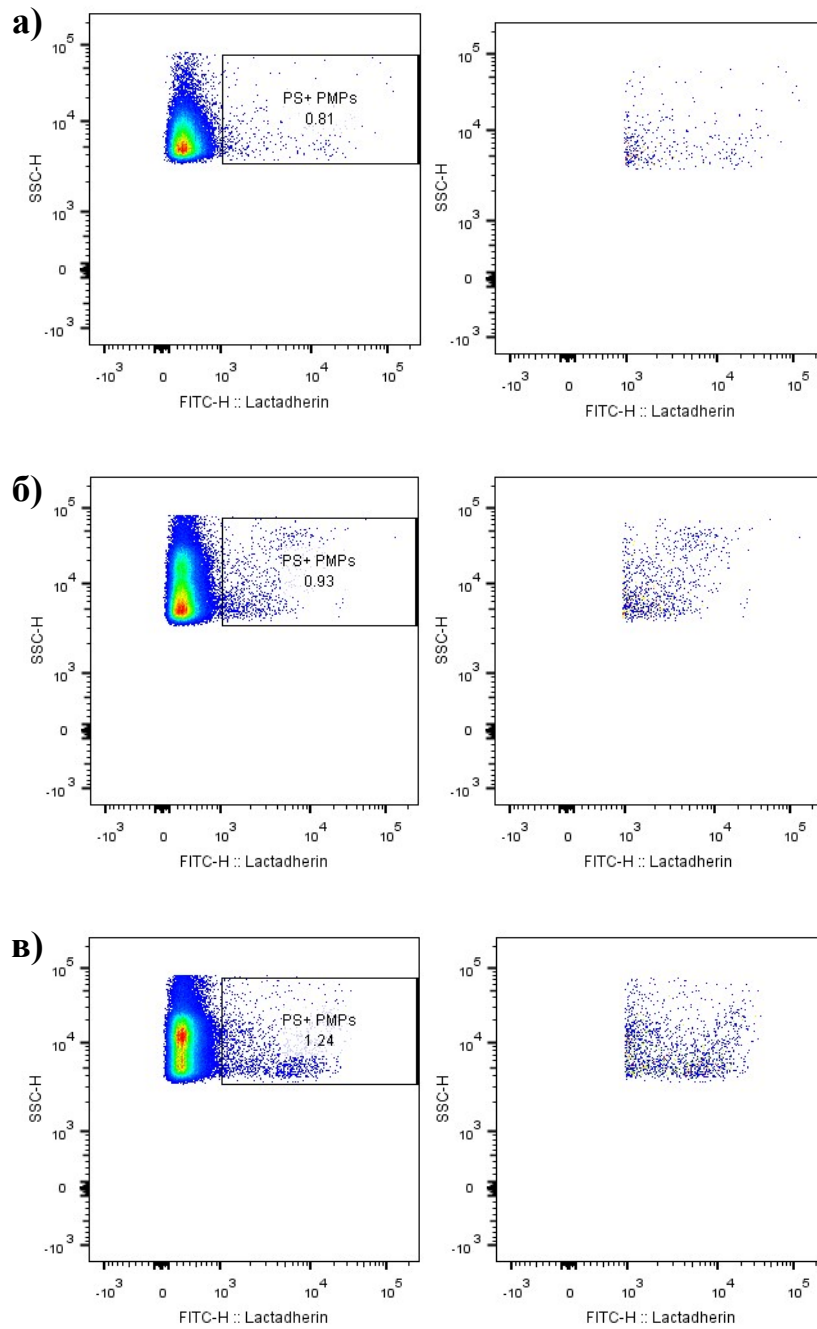


График 6. Репрезентативни узорци који представљају укупну концентрацију микропартикула (PS^+) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

4.3.2. Концентрација различитих врста микропартикула у контролној и експерименталној групи

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

Вредности концентрације МП су се значајно разликовале између контролне и експерименталне групе (График 7).

Концентрација МП које потичу од тромбоцита била је статистички значајно мања у контролну групи у односу на групу пацијента ($p < 0,05$).

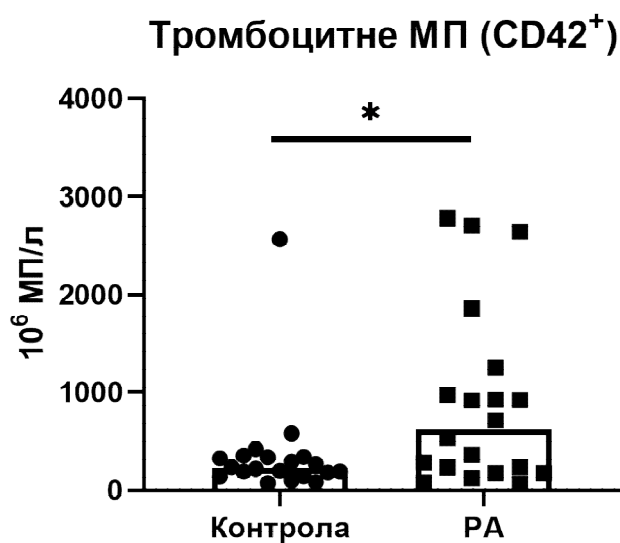


График 7. Концентрација тромбоцитних микропартикула ($CD42^+$) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 22. Концентрација тромбоцитних микропартикула ($CD42^+$) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Контрола	226,50 (71,00 – 2565,00)	360,24
РА	621,00 (65,00 – 2782,00)	895,75

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

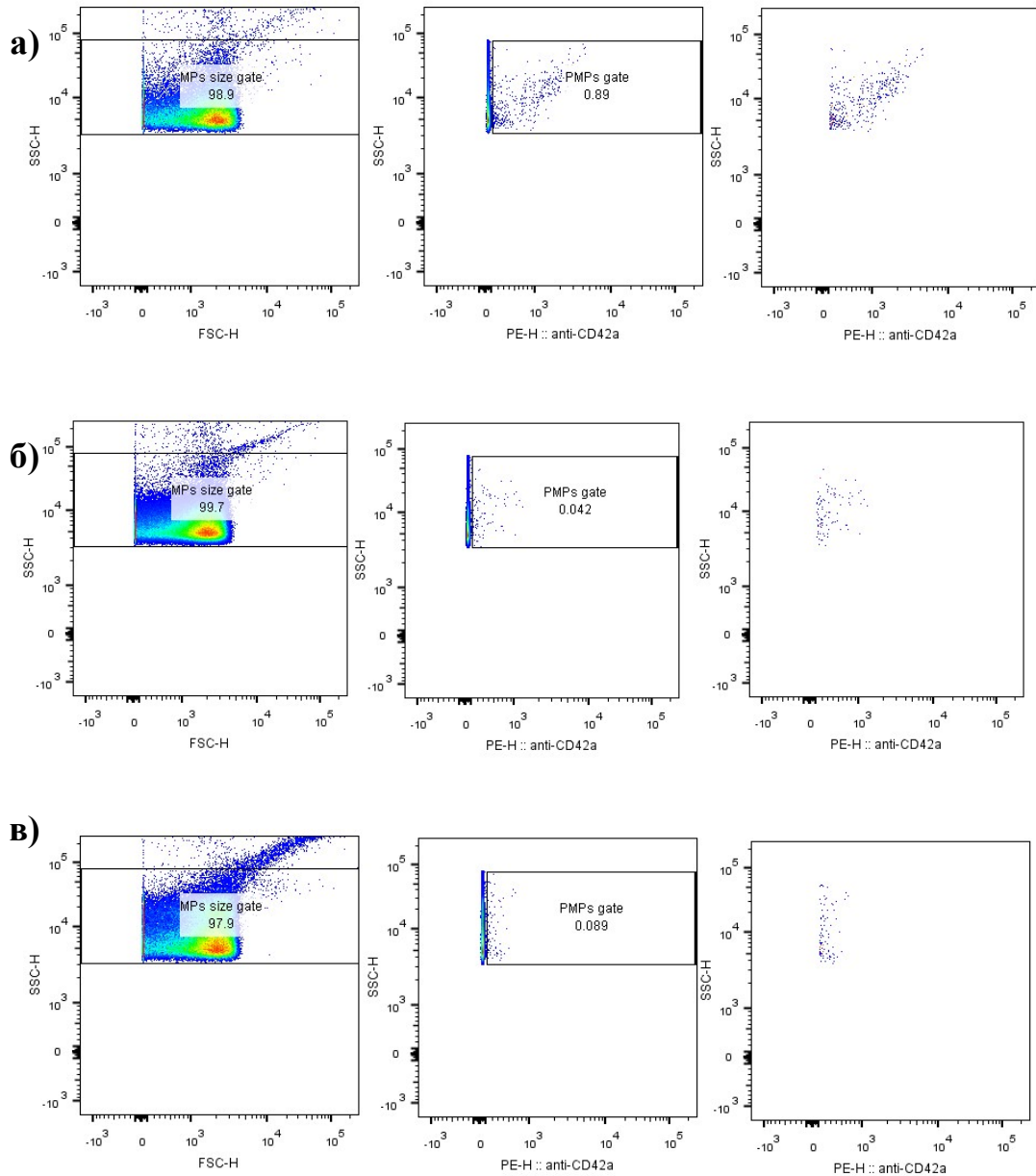


График 8. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула који потичу од тромбоцита ($CD42^+$) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

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

Табела 23. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD42a- Lactadherin+	Q2: anti-CD42a+ Lactadherin+	Q3: anti-CD42a+ Lactadherin-	Q4: anti-CD42a- Lactadherin-
Контрола	/	63,23 ± 22,10	36,77 ± 22,21	/
РА	/	54,35 ± 28,02	45,65 ± 28,02	/

Вредности су представљене као проценат. Q1 – везикуле негативне на CD42a и позитивне на лактадхерин; Q2 – везикуле позитивне на CD42a и позитивне на лактадхерин; Q3 – везикуле позитивне на CD42a и негативне на лактадхерин; Q4 – везикуле негативне на CD42a и негативне на лактадхерин.

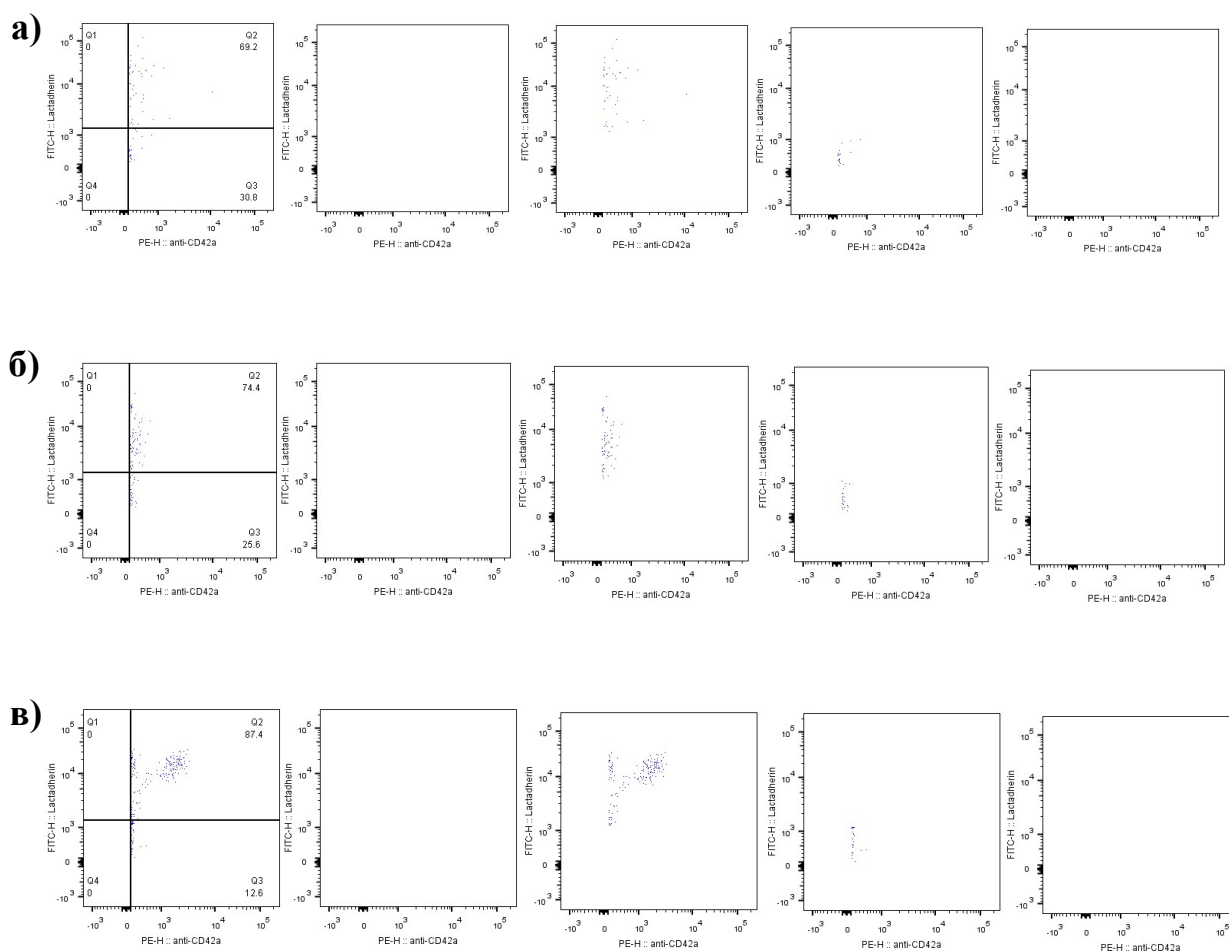


График 9. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од тромбоцита ($CD42^+$) на основу PS^+/PS^- у а) – тритон групи; б) – контролној групи; в) – експерименталној групи.

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

Вредности концентрације МП су се значајно разликовале између контролне и експерименталне групе.

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

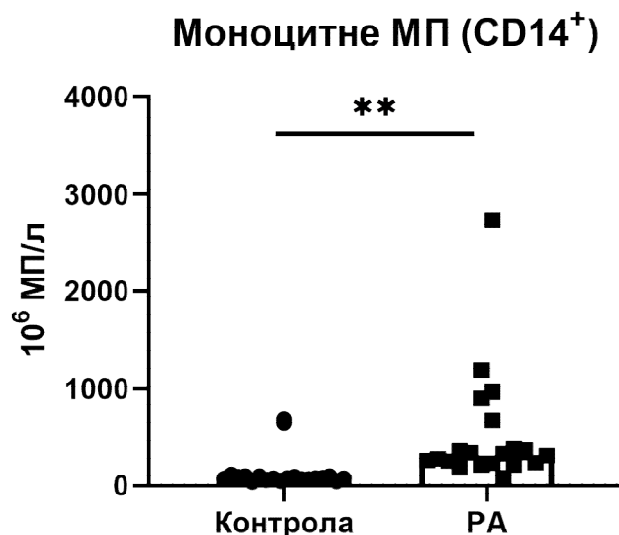


График 10. Концентрација моноцитних микропатрикула ($CD14^+$) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 24. Концентрација моноцитних микропартикула ($CD14^+$) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Контрола	75,00 (38,00 – 689,00)	133,81
РА	321,00 (75,00 – 2727,00)	525,42

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

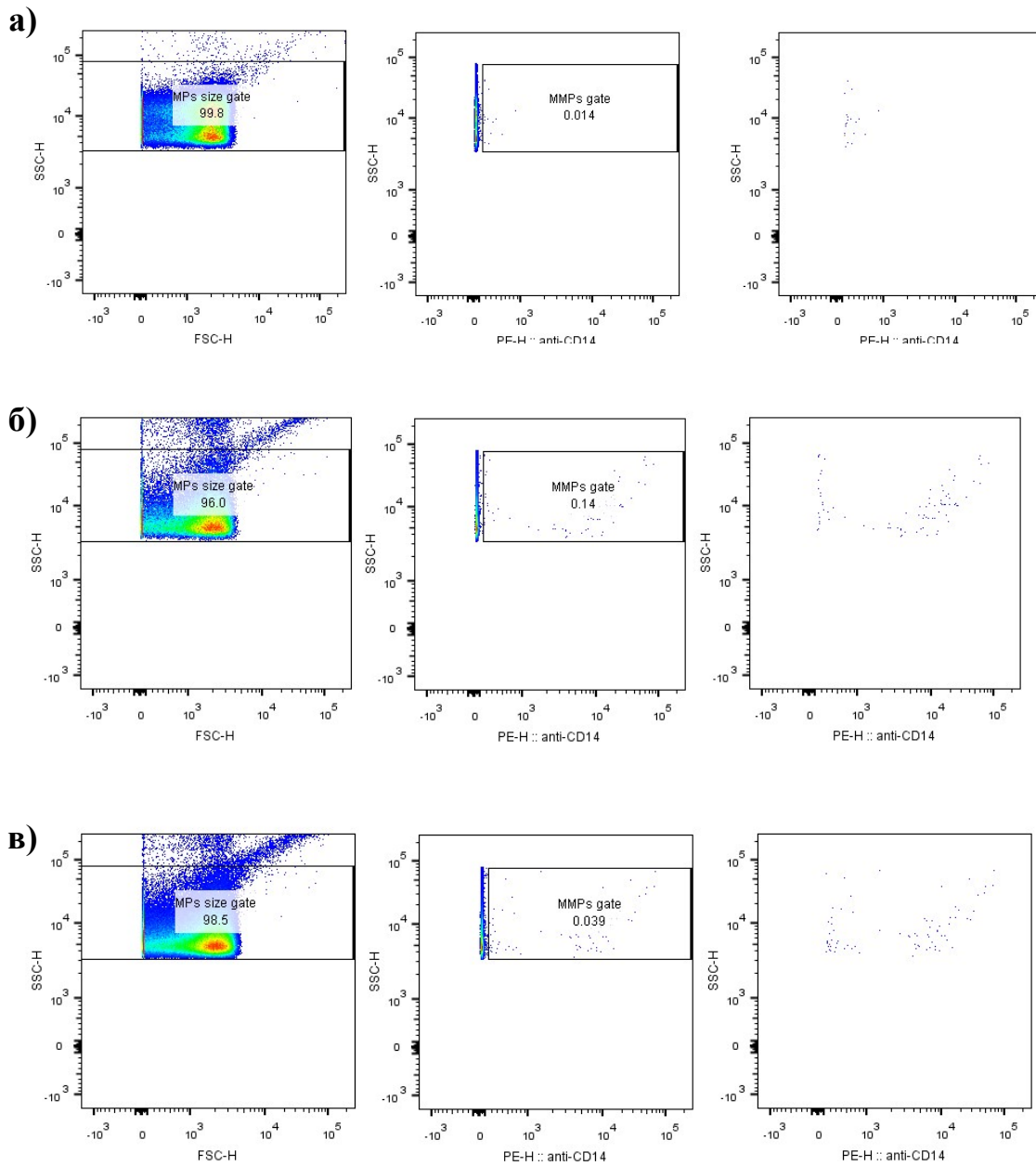


График 11. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од моноцита ($CD14^+$) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

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

Табела 25. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD14- Lactadherin+	Q2: anti-CD14+ Lactadherin+	Q3: anti-CD14+ Lactadherin-	Q4: anti-CD14- Lactadherin-
Контрола	/	38,50 ± 23,41	61,50 ± 23,41	/
РА	/	37,45 ± 20,45	62,55 ± 20,45	/

Вредности су представљене као проценат. Q1 – везикуле негативне на CD14 и позитивне на лактадхерин; Q2 – везикуле позитивне на CD14 и позитивне на лактадхерин; Q3 – везикуле позитивне на CD14 и негативне на лактадхерин; Q4 – везикуле негативне на CD14 и негативне на лактадхерин.

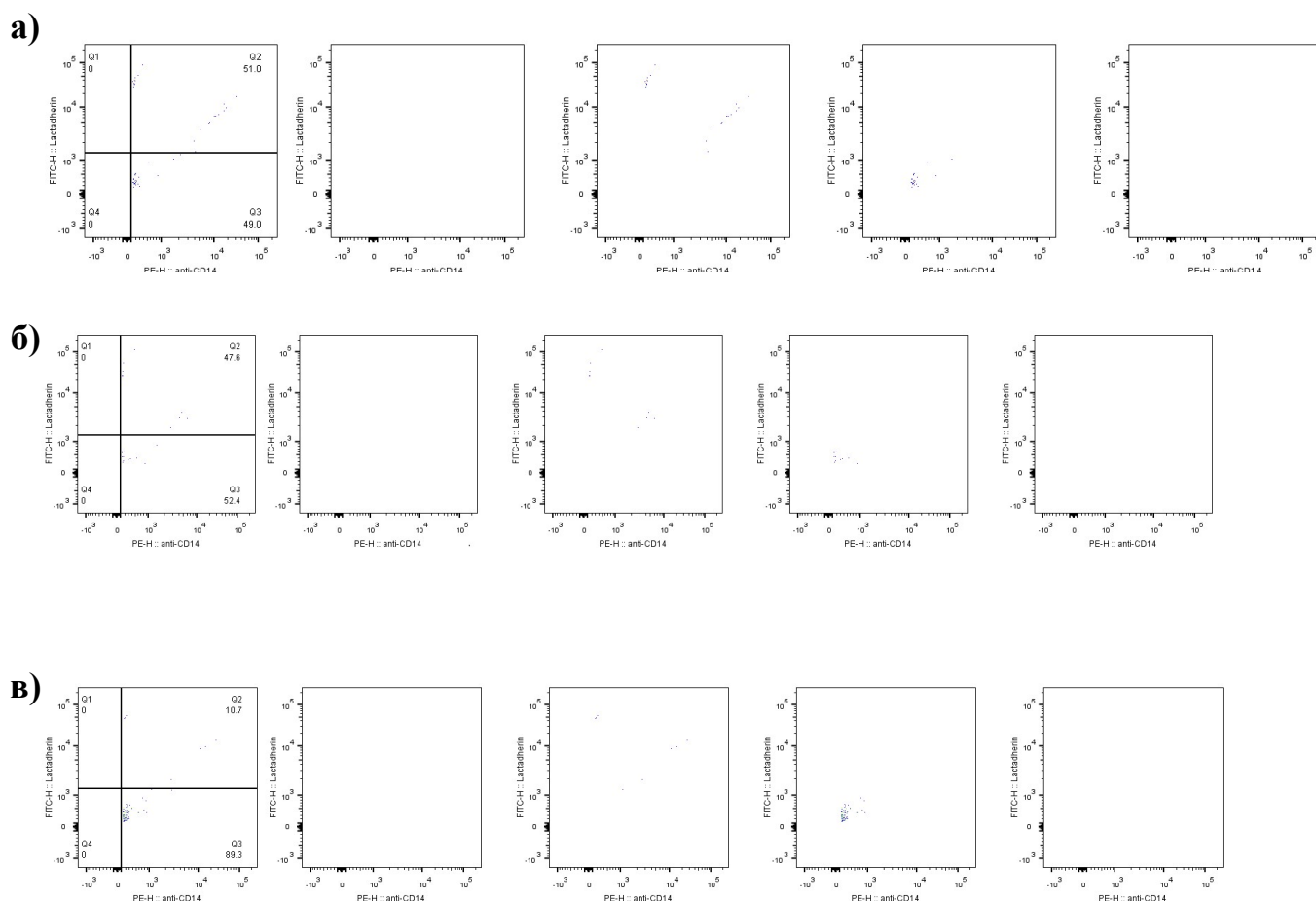


График 12. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од моноцита ($CD14^+$) на основу PS^+/PS^- у а) – тритон групи; б) – контролној групи; в) – експерименталној групи

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

Вредности концентрације МП које потичу од леукоцита значајно су се разликовале између контролне групе и пацијената са РА.

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

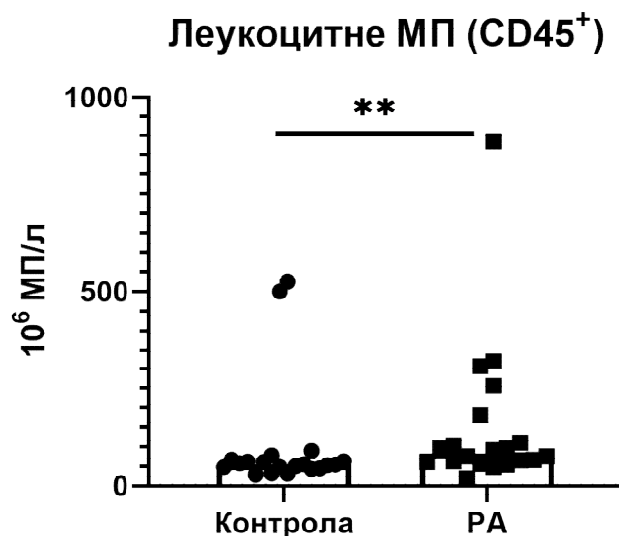


График 13. Концентрација леукоцитних микропартикула ($CD45^+$) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 26. Концентрација леукоцитних микропартикула ($CD45^+$) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Контрола	55,00 (29,00 – 525,00)	99,53
РА	83,00 (19,00 – 886,00)	151,56

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

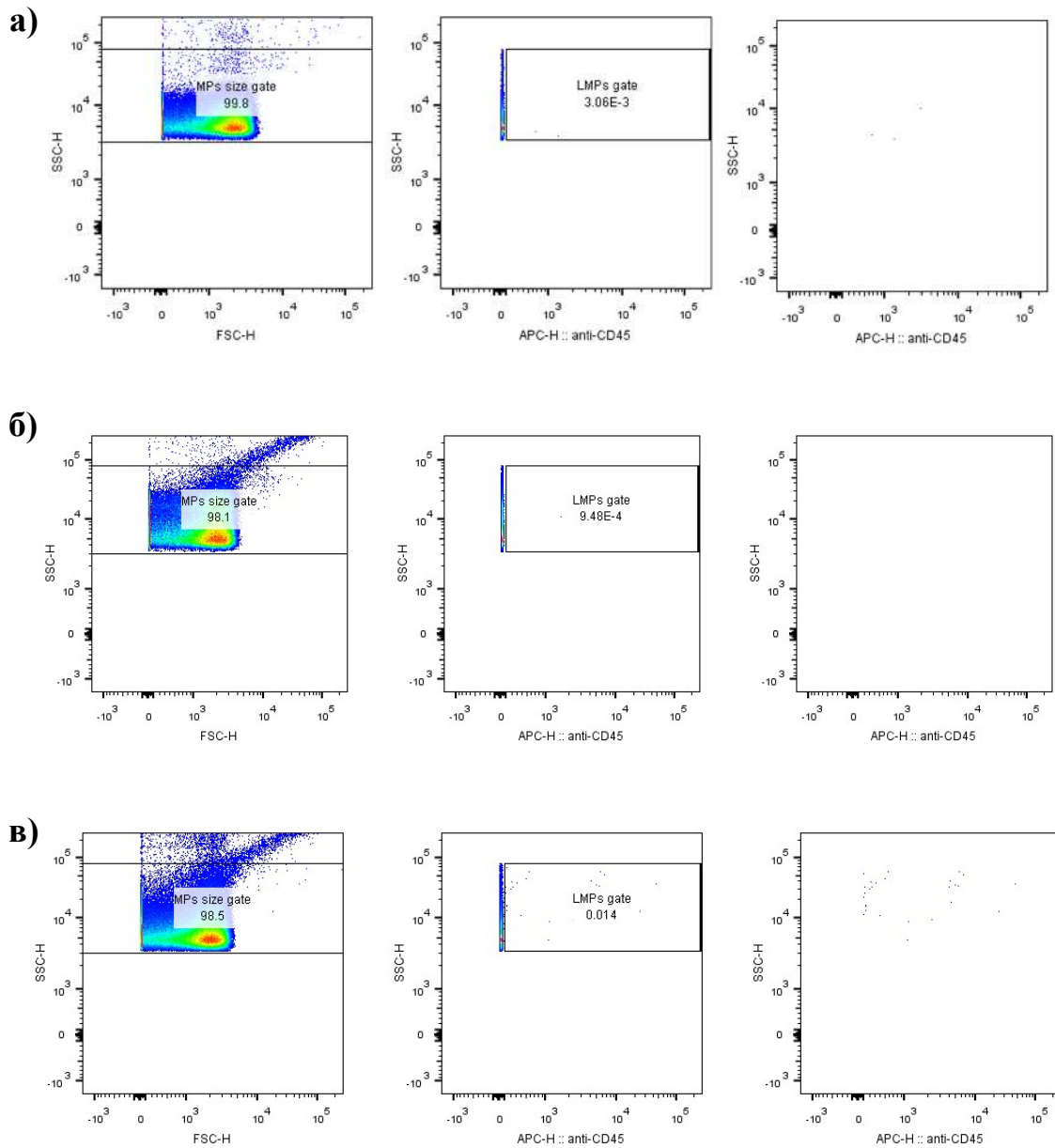


График 14. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од леукоцита ($CD45^+$) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

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

Табела 27. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD45- Lactadherin+	Q2: anti-CD45+ Lactadherin+	Q3: anti-CD45+ Lactadherin-	Q4: anti-CD45- Lactadherin-
Контрола	/	18,50 ± 34,17	81,50 ± 34,17	/
РА	/	14,65 ± 26,33	85,35 ± 26,33	/

Вредности су представљене као проценат. Q1 – везикуле негативне на CD45 и позитивне на лактадхерин; Q2 – везикуле позитивне на CD45 и позитивне на лактадхерин; Q3 – везикуле позитивне на CD45 и негативне на лактадхерин; Q4 – везикуле негативне на CD45 и негативне на лактадхерин.

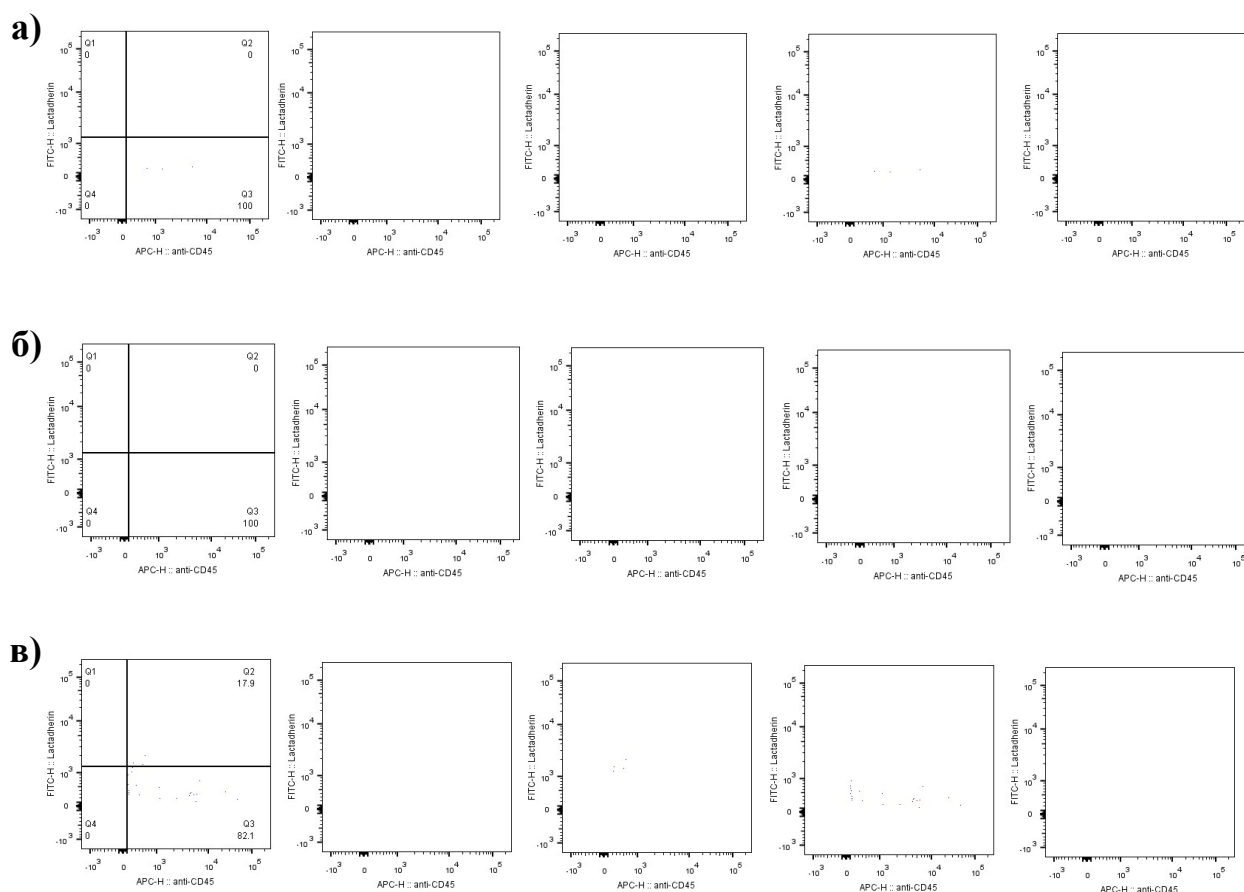


График 15. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од леукоцита ($CD45^+$) на основу PS^+/PS^- у а) – тритон групи; б) – контролној групи; в) – експерименталној групи.

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

Вредности концентрације МП које потичу од ткивног фактора нису се значајно разликовале између контролне и експерименталне групе.

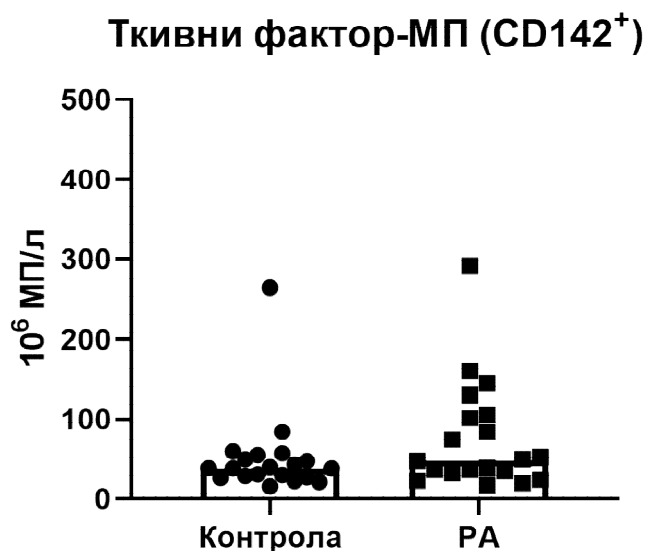


График 16. Концентрација микропартикула које потичу од ткивног фактора (CD142⁺) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности *p<0,05; **p<0,01.

Табела 28. Концентрација микропартикула које потичу од ткивног фактора (CD142⁺) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10 ⁶)
Контрола	38,00 (15,00 – 264,00)	50,25
РА	48,00 (16,00 – 292,00)	74,84

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

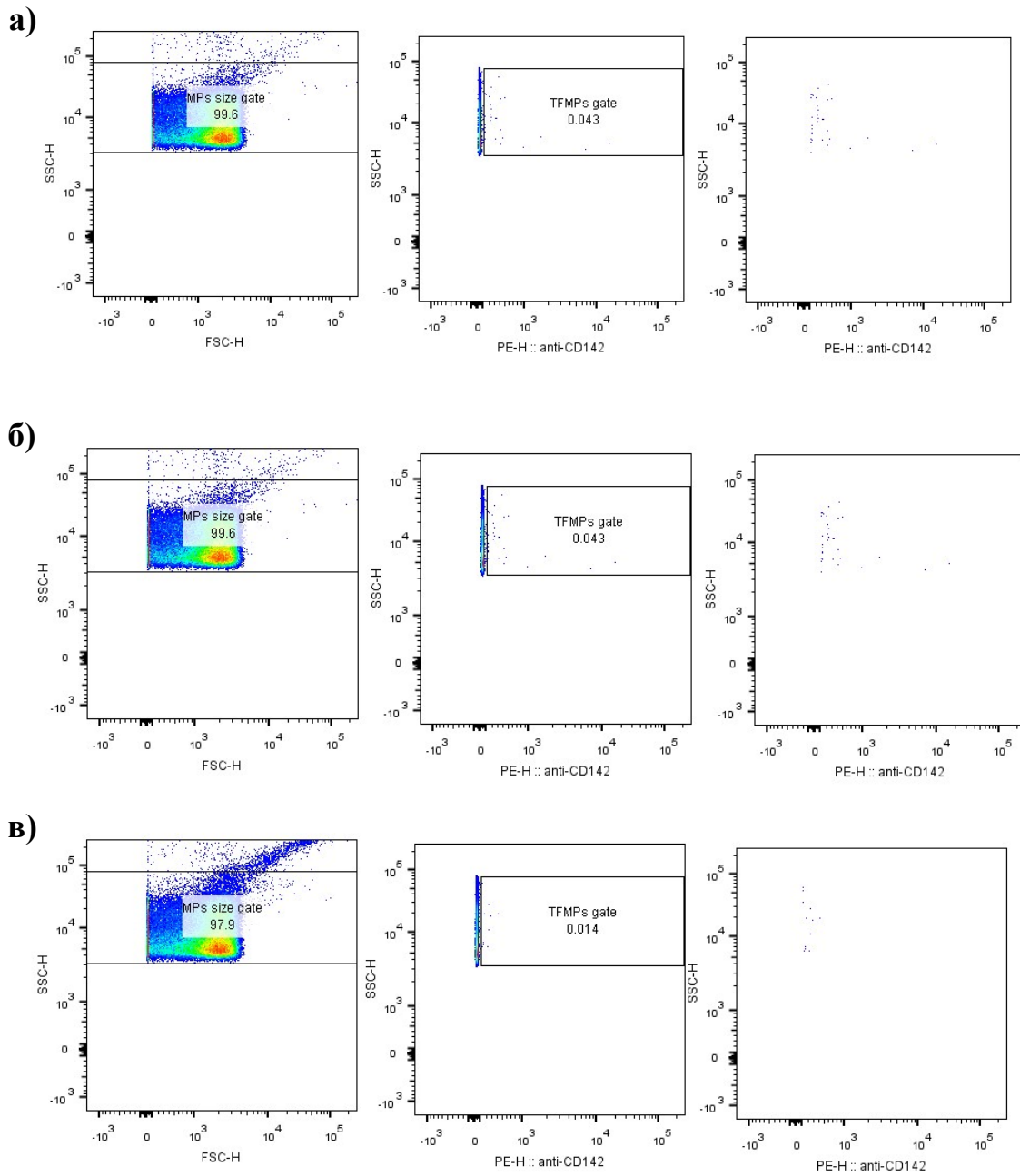


График 17. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од ткивног фактора ($CD142^+$) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

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

Табела 29. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD142- Lactadherin+	Q2: anti-CD142+ Lactadherin+	Q3: anti-CD142+ Lactadherin-	Q4: anti-CD142- Lactadherin-
Контрола	/	41,46 ± 23,00	58,54 ± 23,00	/
РА	/	39,13 ± 27,57	60,87 ± 27,57	/

Вредности су представљене као проценат. Q1 – везикуле негативне на CD142 и позитивне на лактадхерин; Q2 – везикуле позитивне на CD142 и позитивне на лактадхерин; Q3 – везикуле позитивне на CD142 и негативне на лактадхерин; Q4 – везикуле негативне на CD142 и негативне на лактадхерин.

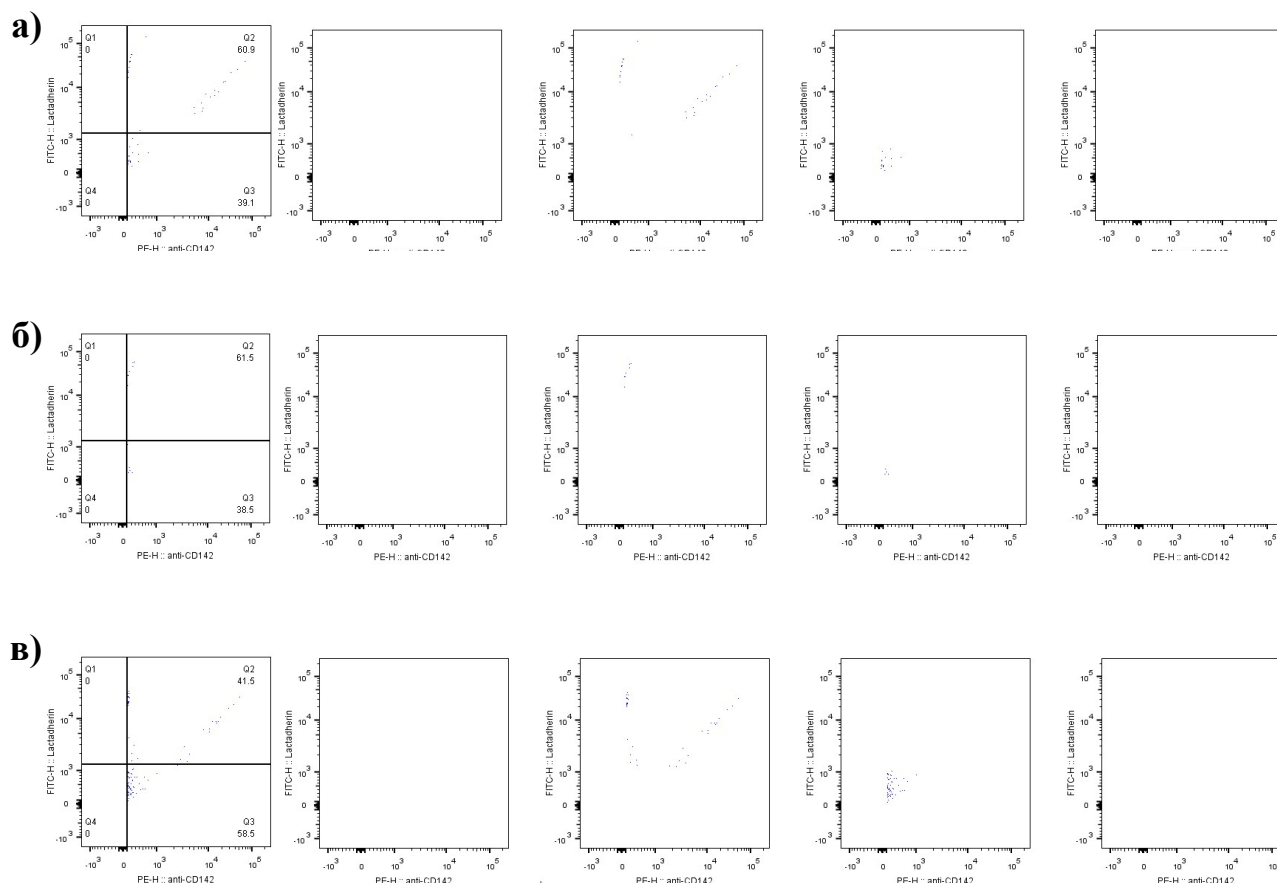


График 18. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од ткивног фактора (CD142⁺) на основу PS⁺/PS⁻ у а) – тритон групи; б) – контролној групи; в) – експерименталној групи.

4.3.2.9. Концентрација микропартикула које потичу од ендотела (CD144⁺)

Вредности концентрације МП које потичу од ендотела нису се значајно разликовале између контролне и експерименталне групе.

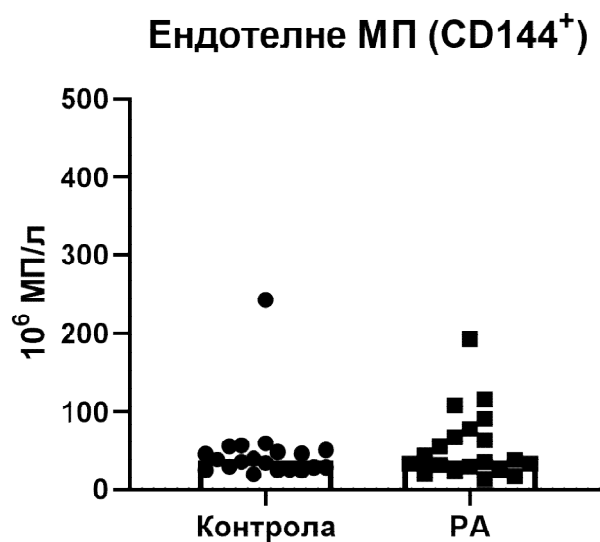


График 19. Концентрација микропартикула које потичу од ендотела (CD144⁺) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 30. Концентрација микропартикула које потичу од ендотела (CD144⁺) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10 ⁶)
Контрола	36,50 (19,00 – 243,00)	47,36
РА	36,50 (13,00 – 193,00)	55,34

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум)

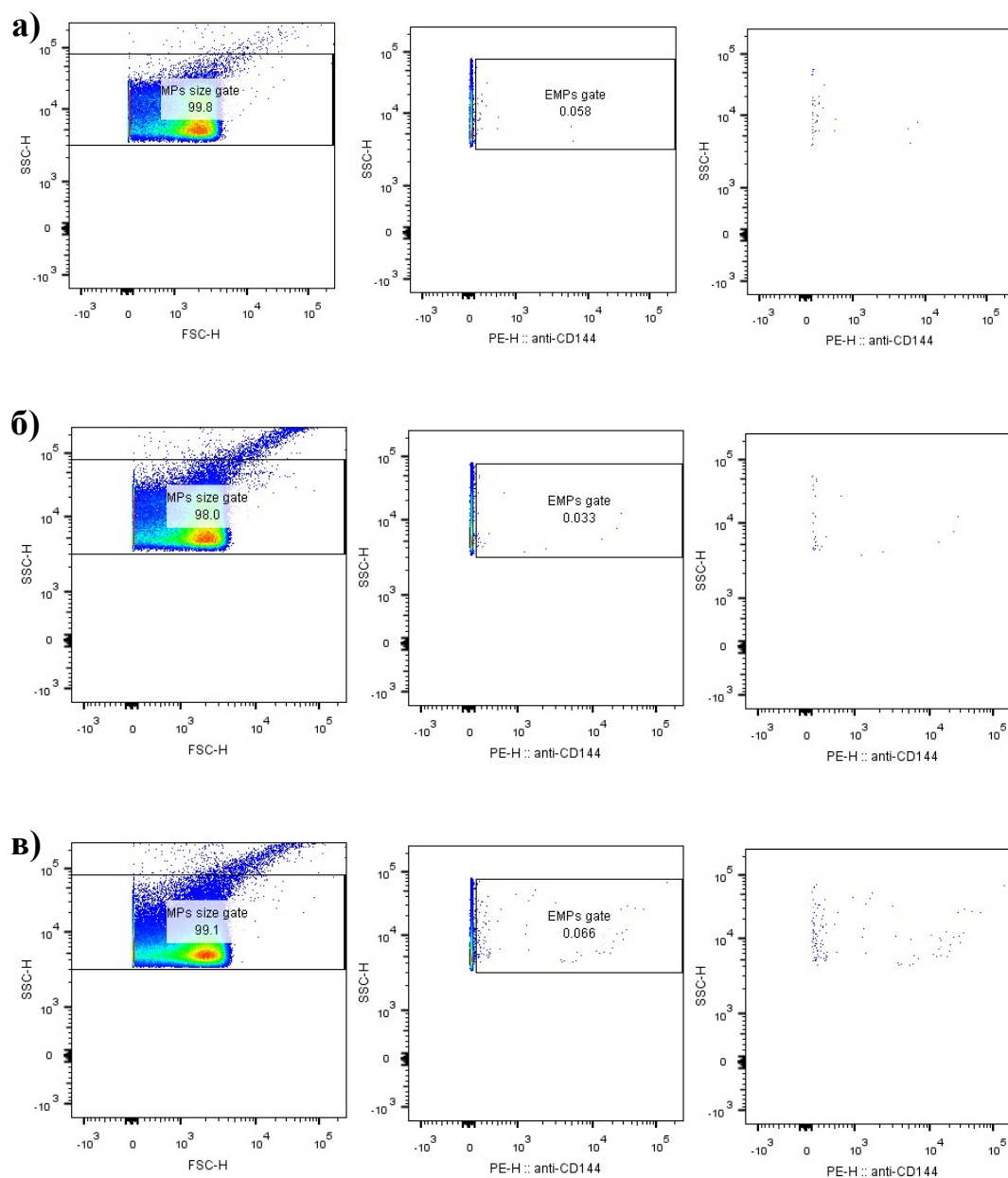


График 20. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од ендотела ($CD144^+$) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

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

Табела 31. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD144- Lactadherin+	Q2: anti-CD144+ Lactadherin+	Q3: anti-CD144+ Lactadherin-	Q4: anti-CD144- Lactadherin-
Контрола	/	37,63 ± 22,00	62,37 ± 22,00	/
РА	/	48,31 ± 25,51	51,69 ± 25,51	/

Вредности су представљене као проценат. Q1 – везикуле негативне на CD144 и позитивне на лактадхерин; Q2 – везикуле позитивне на CD144 и позитивне на лактадхерин; Q3 – везикуле позитивне на CD144 и негативне на лактадхерин; Q4 – везикуле негативне на CD144 и негативне на лактадхерин.

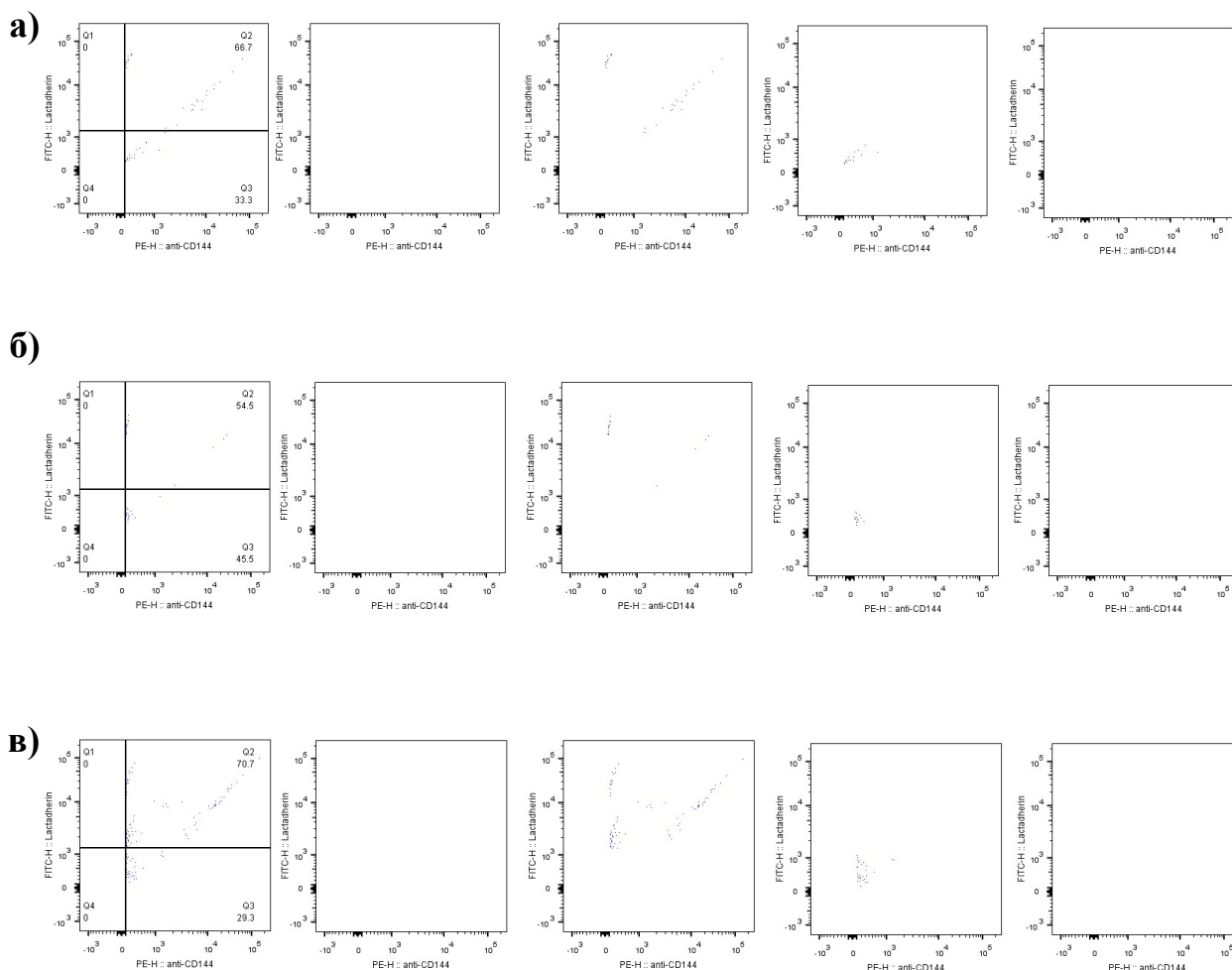


График 21. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од ендотела (CD144⁺) на основу PS⁺/PS⁻ у а) – тритон групи; б) – контролној групи; в) – експерименталној групи.

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

Вредности микропартикула које потичу од П-селектина значајно су се разликовале између контролне групе и пацијената са РА.

Концентрација микропартикула које потичу од П-селектина била је статистички значајно мања у контролној групи у односу на РА групу ($p < 0,05$).

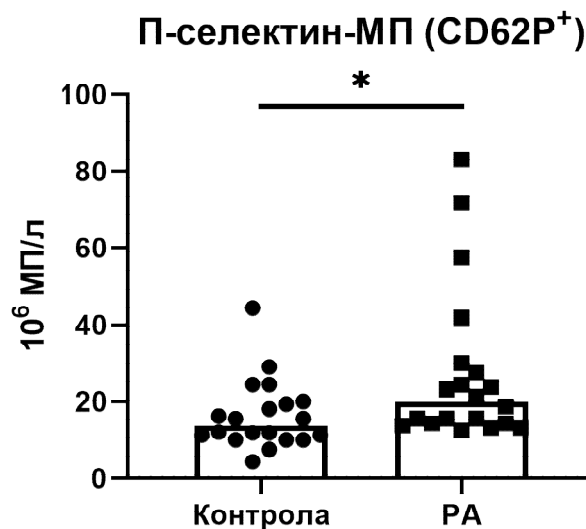


График 22. Концентрација микропартикула које потичу од П-селектина ($CD62P^+$) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 32. Концентрација микропартикула које потичу од П-селектина ($CD62P^+$) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Контрола	14,00 (4,00 – 44,00)	16,36
РА	20,00 (13,00 – 83,00)	27,56

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

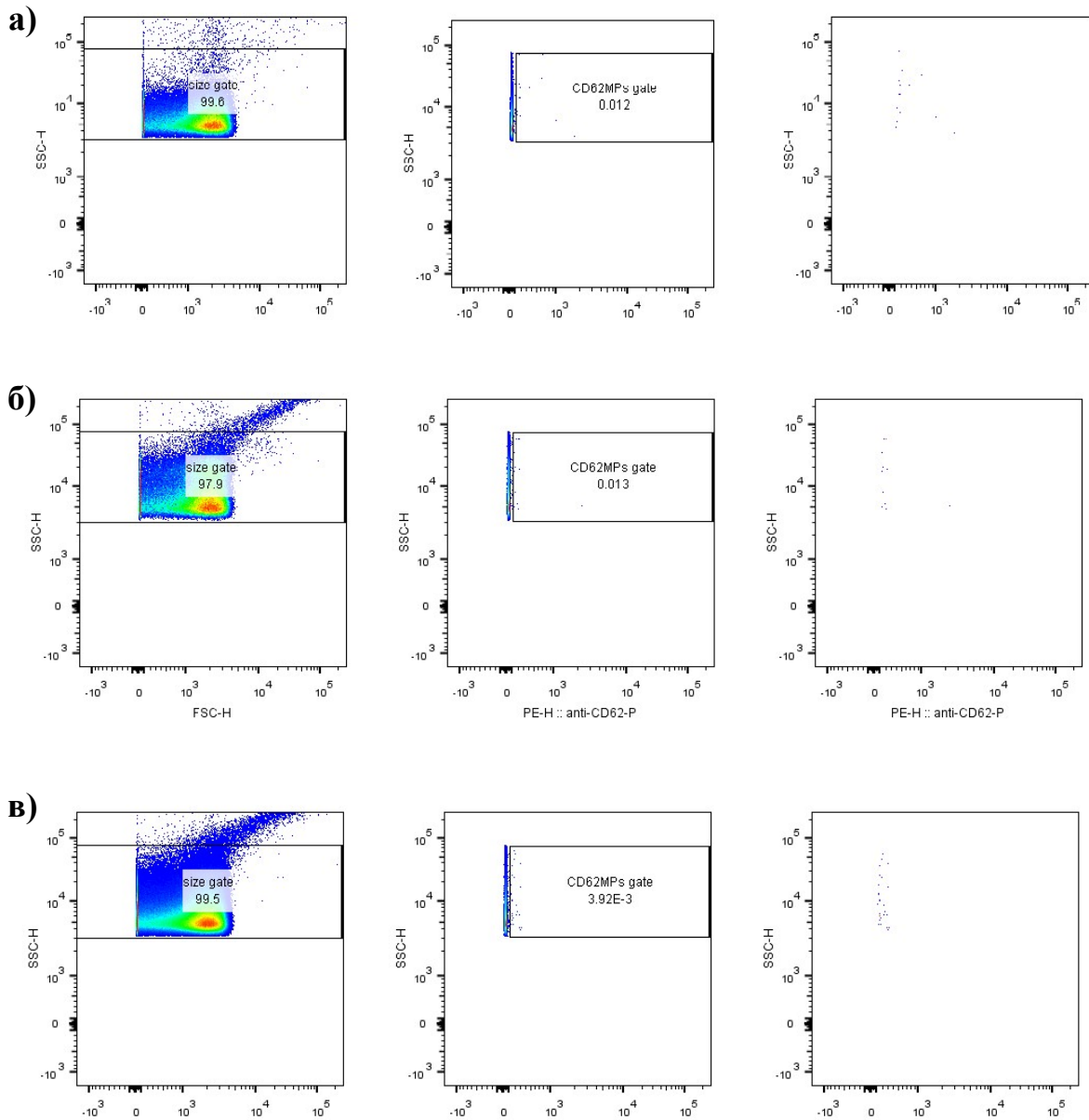


График 23. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од П-селектина (CD62P⁺) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

4.3.2.12. Микрочестице које потичу од П-селектина (CD62P⁺) на основу присуства/одсуства фосфатидилсерина PS⁺/PS⁻

Табела 33. Удео микрочестица на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD62P- Lactadherin+	Q2: anti-CD62P+ Lactadherin+	Q3: anti-CD62P+ Lactadherin-	Q4: anti-CD62P- Lactadherin-
Контрола	/	79,00 ± 21,27	21,00 ± 21,27	/
РА	/	76,60 ± 24,21	23,40 ± 24,21	/

Вредности су представљене као проценат. Q1 – везикуле негативне на CD62P и позитивне на лактадхерин; Q2 – везикуле позитивне на CD62P и позитивне на лактадхерин; Q3 – везикуле позитивне на CD62P и негативне на лактадхерин; Q4 – везикуле негативне на CD62P и негативне на лактадхерин.

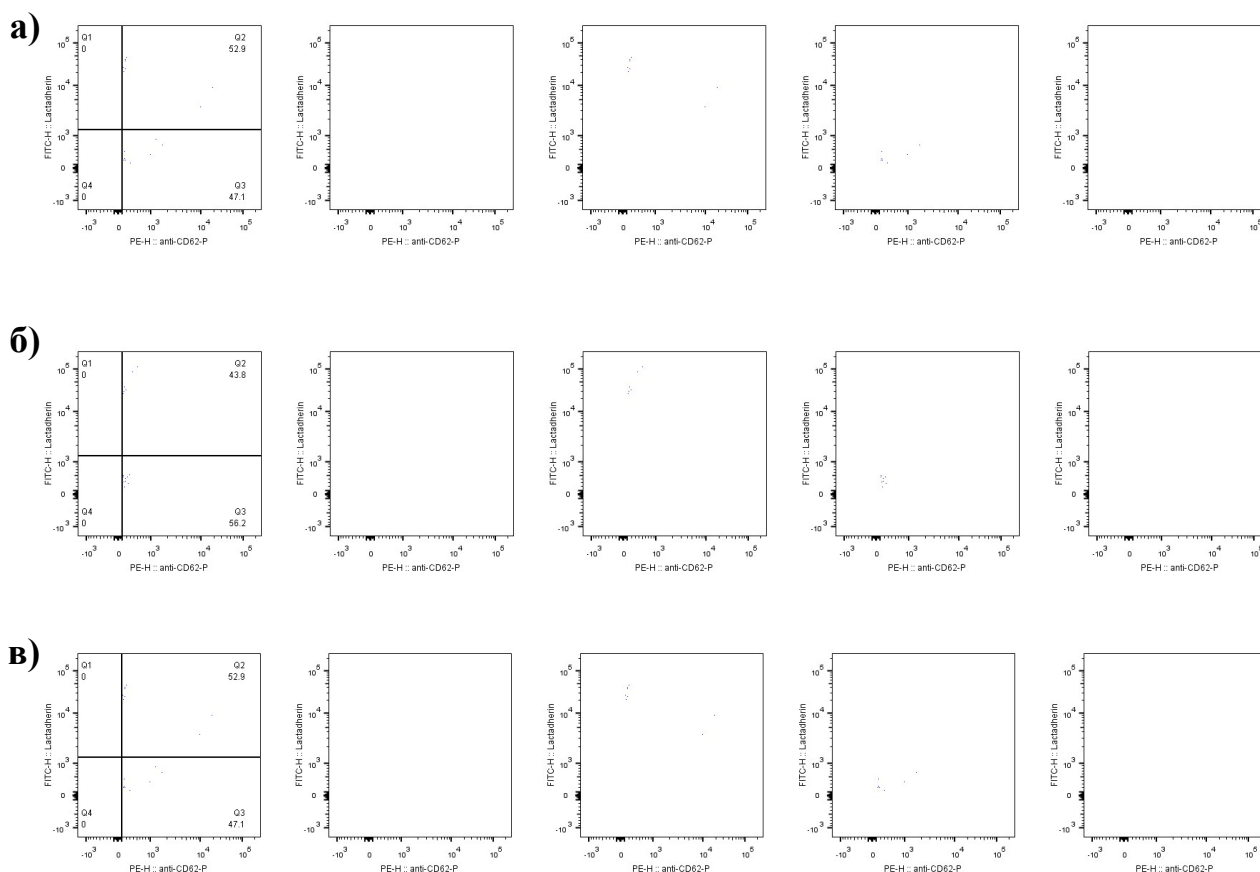


График 24. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микрочестица које потичу од П-селектина (CD62P⁺) на основу PS⁺/PS⁻ у а) – тритон групи; б) – контролној групи; в) – експерименталној групи.

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

Вредности микропартикула које потичу од Е-селектина нису се значајно разликовале између контролне групе и експерименталне групе.

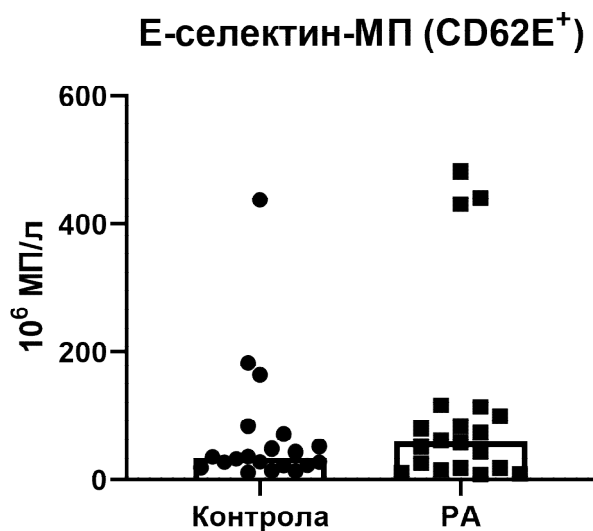


График 25. Концентрација микропартикула које потичу од Е-селектина ($CD62E^+$) у контролној и експерименталној групи. Ниво значајности * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Табела 34. Концентрација микропартикула које потичу од Е-селектина ($CD62E^+$) у контролној и експерименталној групи.

	Медијана (минимум-максимум)	Концентрација МП/л (10^6)
Контрола	34,50 (12,00 – 438,00)	69,09
РА	60,50 (8,00 – 482,00)	112,39

Вредности су представљене као медијана (минимум – максимум).

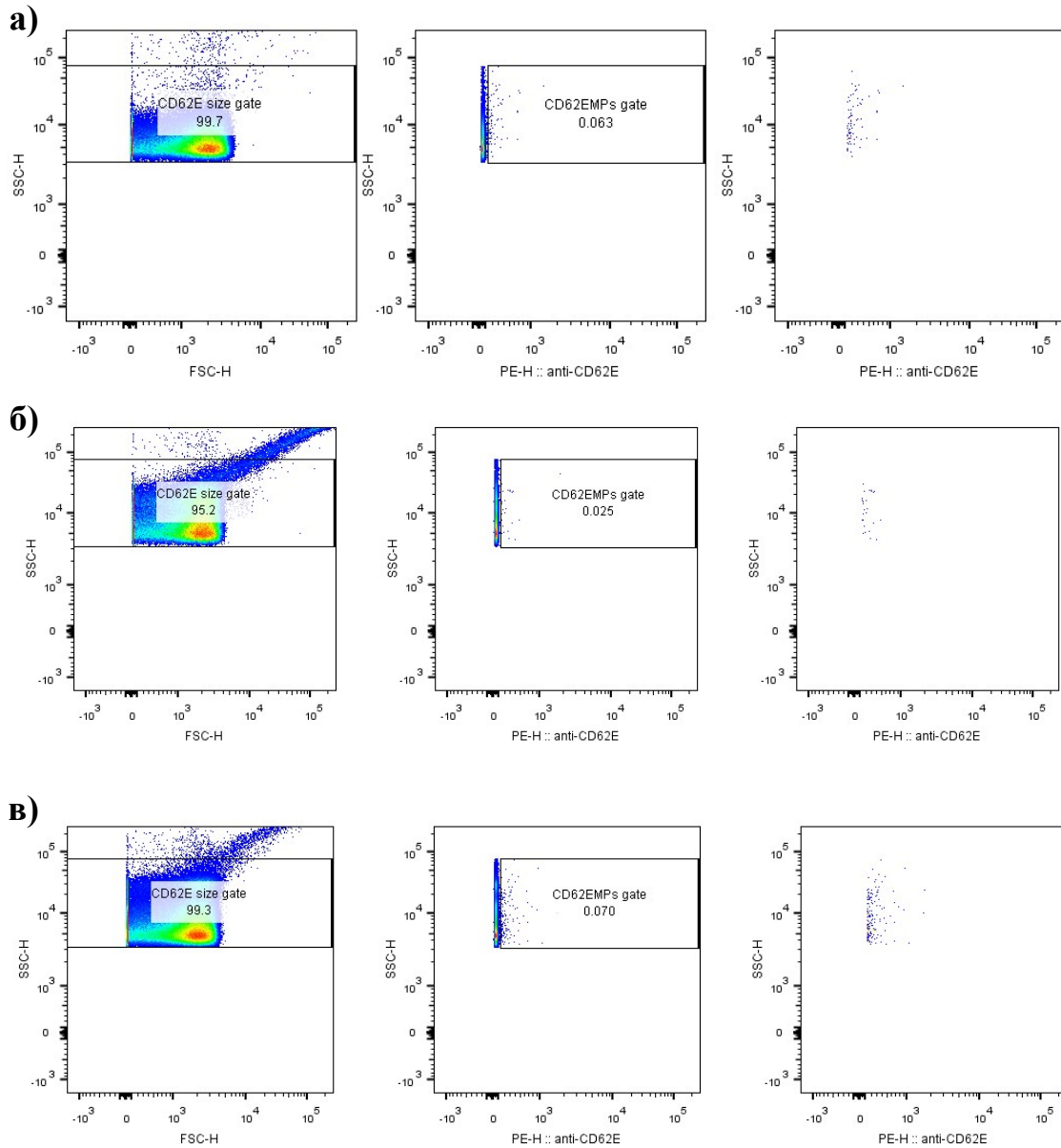


График 26. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од Е-селектина (CD62E⁺) у **а)** – тритон групи; **б)** – контролној групи; **в)** – експерименталној групи.

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

Табела 35. Удео микропартикула на основу експримирања/неекспримирања различитих антигена на својој површини

	Q1: anti-CD62E- Lactadherin+	Q2: anti-CD62E+ Lactadherin+	Q3: anti-CD62E+ Lactadherin-	Q4: anti-CD62E- Lactadherin-
Контрола	/	49,80 ± 23,00	50,20 ± 23,00	/
РА	/	48,75 ± 21,46	51,25 ± 21,46	/

Вредности су представљене као проценат. Q1 – везикуле негативне на CD62E и позитивне на лактадхерин; Q2 – везикуле позитивне на CD62E и позитивне на лактадхерин; Q3 – везикуле позитивне на CD62E и негативне на лактадхерин; Q4 – везикуле негативне на CD62E и негативне на лактадхерин.

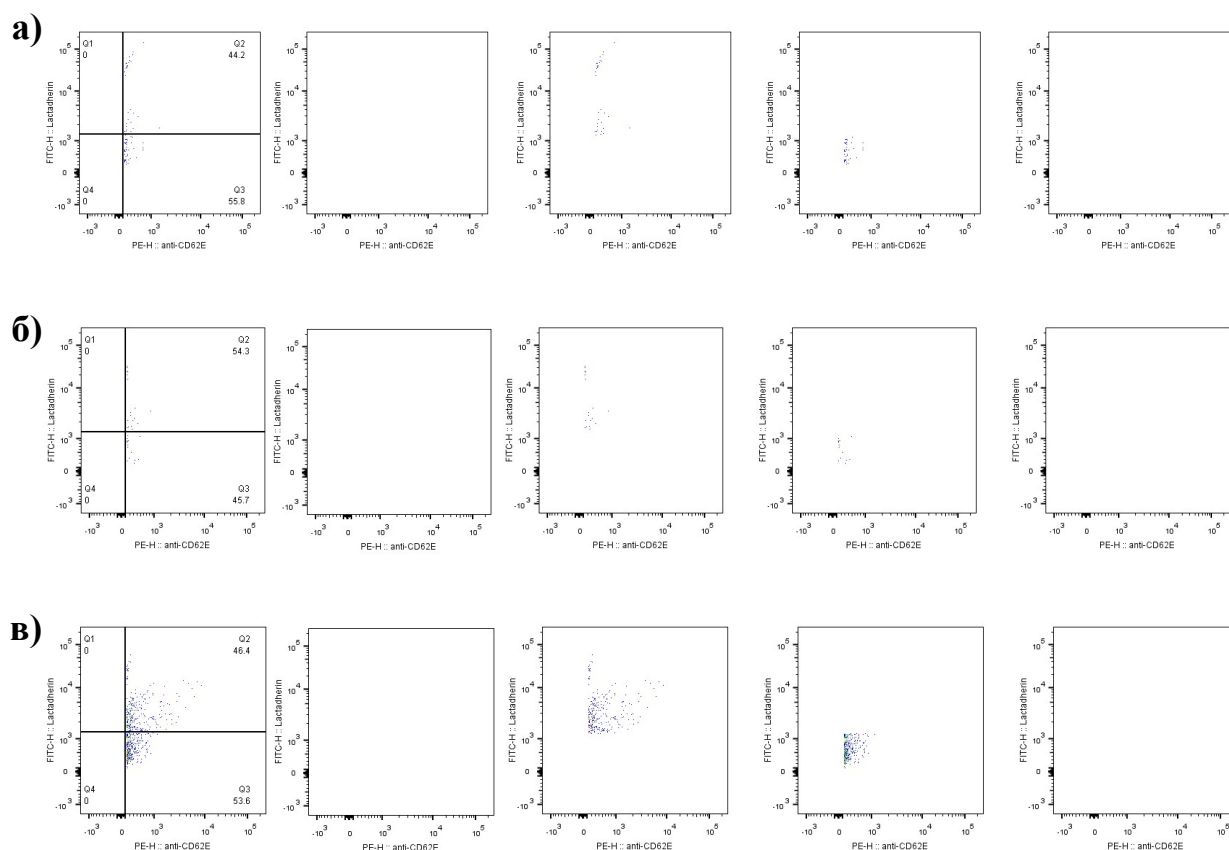


График 27. Репрезентативни узорци који представљају концентрацију микропартикула које потичу од Е-селектина (CD62E⁺) на основу PS⁺/PS⁻ у а) – тритон групи; б) – контролној групи; в) – експерименталној групи.

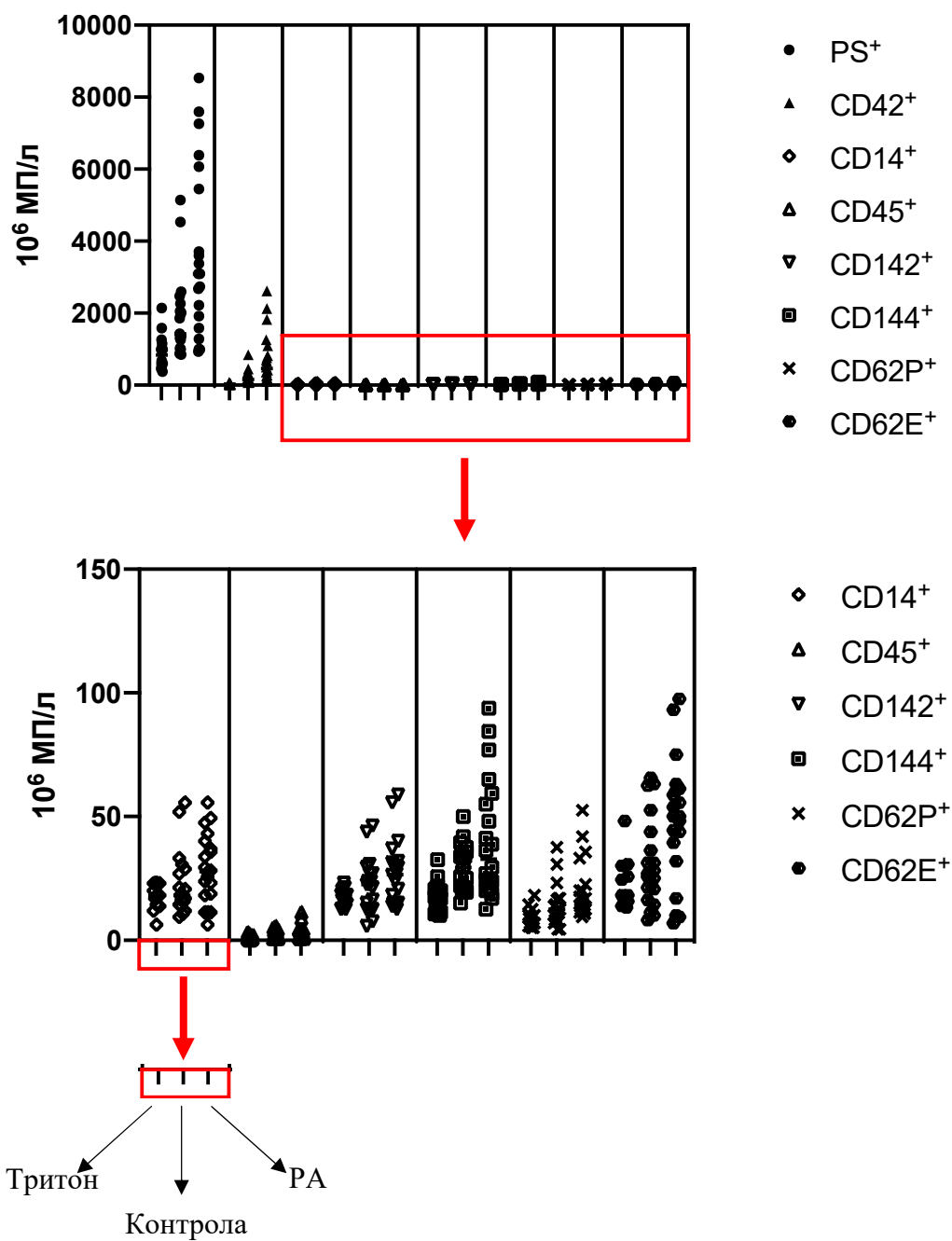


График 28. Упоредни график концентрације испитиваних микропартикула у тритон, контролној и експерименталној групи.

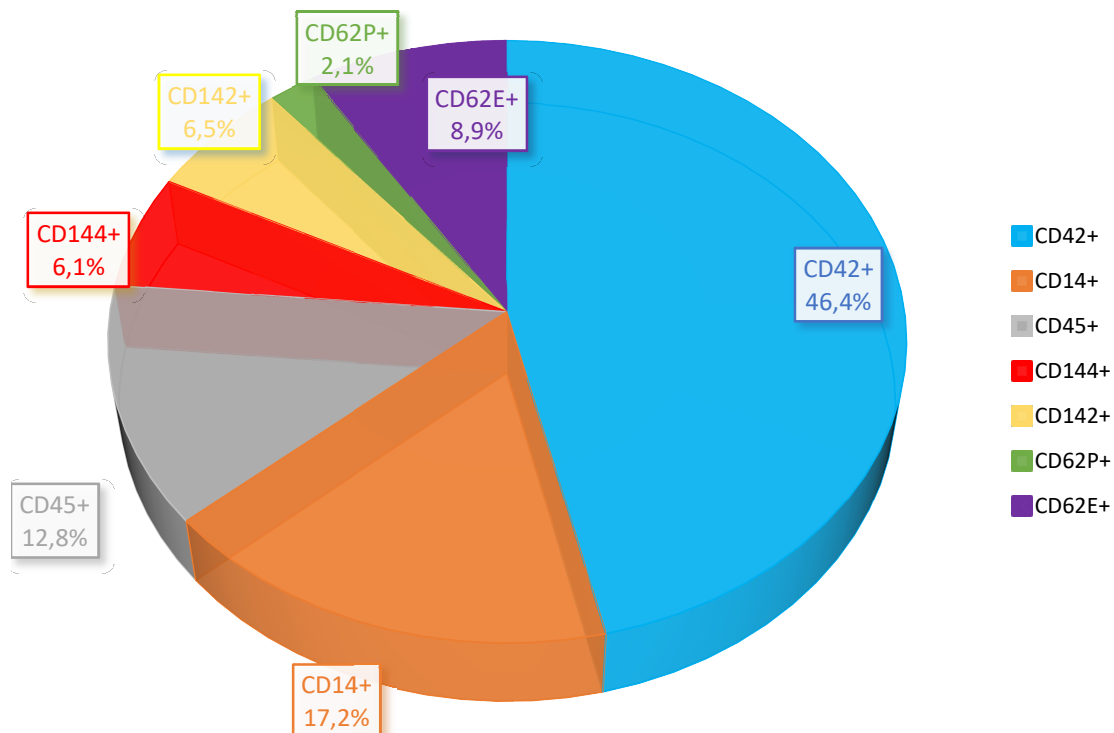


График 29. Распoдела микропартикула у контролној групи у односу на укупан број свих праћених врста микропартикула

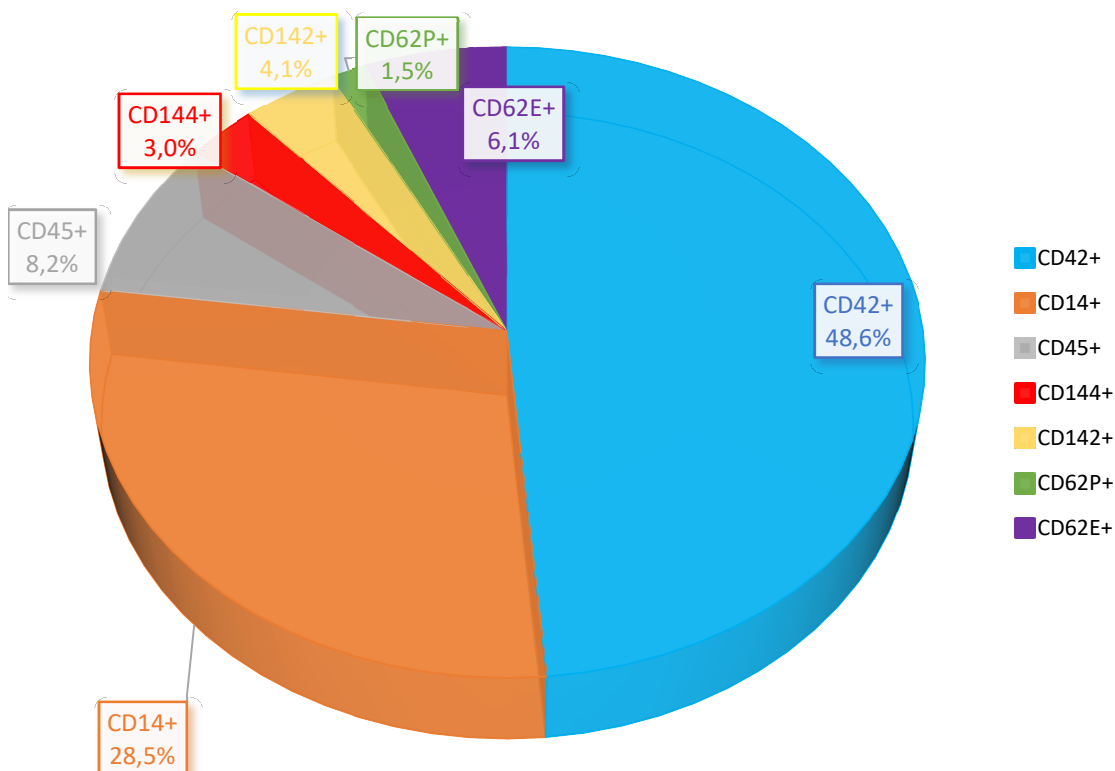


График 30. Распoдела микропартикула у експерименталној групи у односу на укупан број свих праћених врста микропартикула

4.4. Глобалне методе хемостазе

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

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

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

Вредности параметара који прате настанак тромбина приказане су у табели 36.

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

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

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

4.4.2. Утицај менопаузе на настанак тромбина праћен ендогеним тромбин потенцијалом

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

Вредности параметара који прате настанак тромбина као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 37.

Табела 37. Вредности параметара који прате настанак тромбина у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу. Ендогени тромбин потенцијал.

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

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

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

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

Вредности параметара који прате настанак фибрина приказане су у табели 38.

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

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

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

4.4.4. Утицај менопаузе на настанак фибрина праћен укупним хемостатским потенцијалом

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

Вредности параметара који прате настанак фибрина као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 39.

Табела 39. Вредности параметара који прате настанак фибрина у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу. Укупни хемостатски потенцијал.

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

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

4.4.5. Типичне криве агрегације фибрина и фибринолизе

Типичне криве агрегације фибрина за *ОСР* и *ОНР* код испитаника у свим испитиваним подгрупама, представљени су на графицима 31 и 32, показујући повећану агрегацију фибрина (График 31) и продужену фибринолизу (График 32) код пацијената и контрола у менопаузи у поређењу са контролама пре менопаузе.

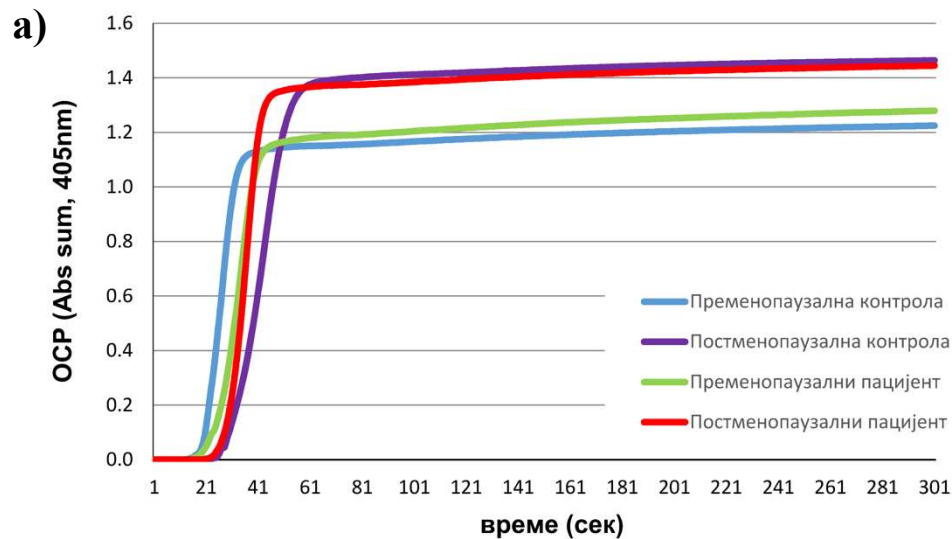


График 31. Репрезентативне криве агрегације фибрина. Укупни коагулациони потенцијал код контрола и пацијената са РА.

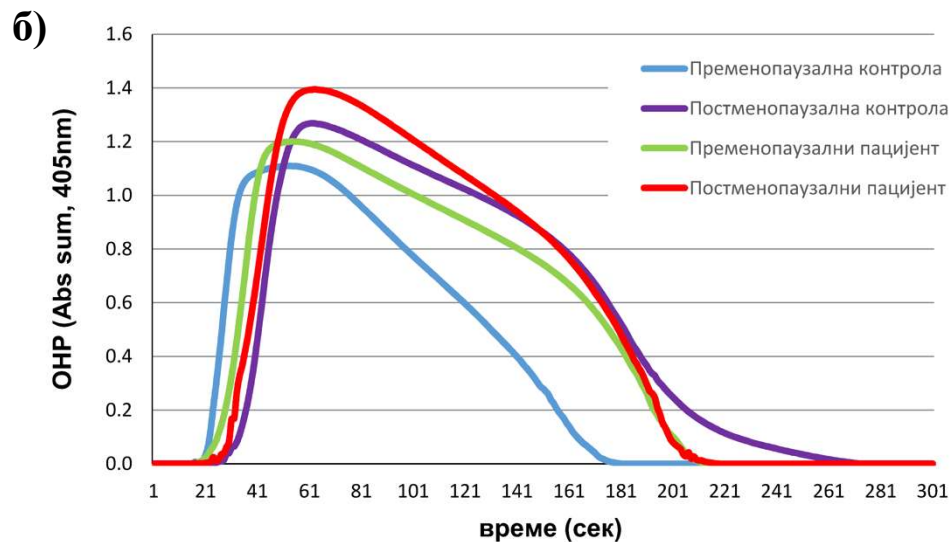


График 32. Репрезентативне криве фибринолизе. Укупни фибринолитички потенцијал код контрола и пацијената са РА.

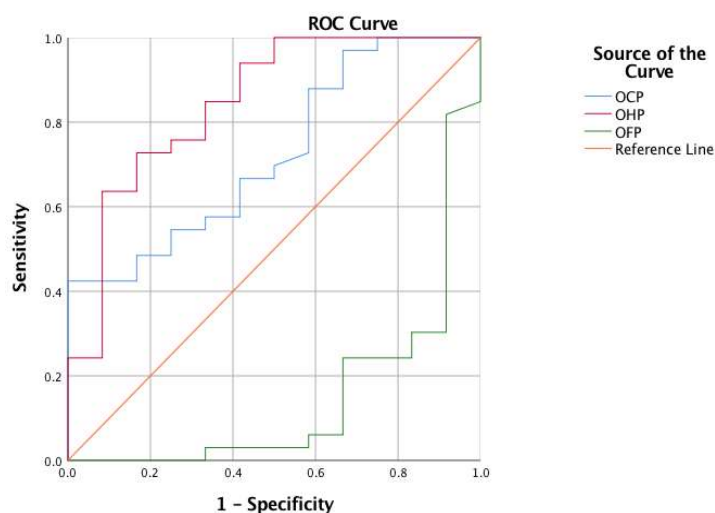
4.4.6. Receiver operating characteristic (ROC) крива

У циљу дијагностиковања и праћења хиперкоагулационог стања код пацијената са РА, спроведена је анализа ROC криве, при чему је праћена површина испод криве, значајност, сензитивност и специфичност. У раду су приказане криве у којима је постојала статистичка значајност у целој групи пацијената оболелих од РА као и у групама праћеним на основу менопаузе. Додатно, посматране су и *Cutoff* вредности (вредности пресека), како би се дефинисале очекиване вредности параметара глобалних метода хемостазе код здравих жена и пацијенткиња оболелих од РА.

За групе и подгрупе које нису приказане, није постојала статистичка значајност за праћене параметре.

4.4.6.1. Укупни хемостатски потенцијал

Анализа параметара ROC криве код здравих жена у менопаузи



На основу анализе ROC криве може се рећи да се сматра да су очекиване вредности глобалних метода хемостазе код здравих жена у менопаузи изнад:
OCP > 329,23 ($p < 0,05$);
OHP > 120,05 ($p < 0,01$);
OFP > 51,8 ($p < 0,01$).

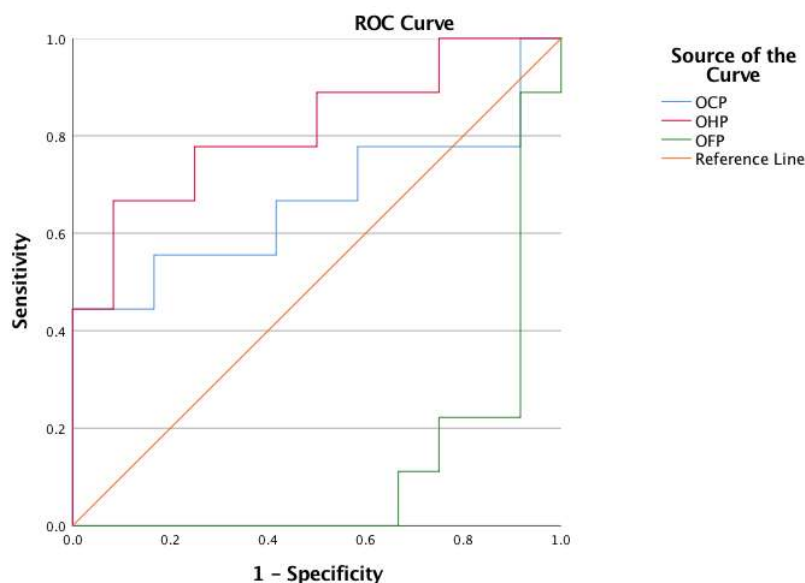
Вредности праћених параметара приказани су у

График 33. ROC крива код здравих жена у менопаузи

Табела 40. Вредности параметара ROC криве праћених код здравих жена у менопаузи.

Контроле у менопаузи					
Површина испод криве			Праћени параметри		
Параметар	Површина (95% Интервал поверења)	p	Вредност пресека <i>Cutoff value</i>	Осетљивост <i>Sensitivity</i> (%)	Специфичност <i>Specificity</i> (%)
<i>OCP</i>	0,723 (0,564-0,883)	0,023	329,23	85	42
<i>OHP</i>	0,846 (0,708-0,983)	0,000	120,05	85	67
<i>OFP</i>	0,148 (0,005-0,291)	0,000	51,8	82	8

OCP – укупни коагулациони потенцијал; **OHP** – укупни хемостатски потенцијал; **OFP** – укупни фибринолитички потенцијал.

Анализа параметара *ROC* криве код пременопаузалних жена са РАГрафик 34. *ROC* крива код пременопаузалних жена са РА

На основу анализе *ROC* криве може се рећи да се сматра да су очекиване вредности глобалних метода хемостазе код жена са РА пре менопаузе изнад:

$$OHP > 130,30 \ (p < 0,05)$$

$$OFP > 63,35 \ (p < 0,05).$$

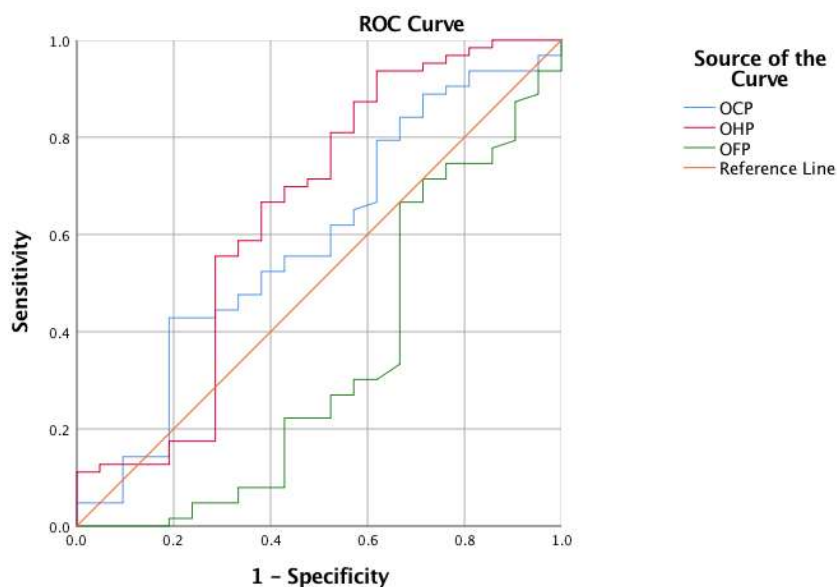
За *OCP* није показана статистичка значајност.

Вредности праћених параметара приказани су у табели 41.

Табела 41. Вредности параметара *ROC* криве праћених код жена са РА у пременопаузи.

Пременопаузалне жене са РА					
Површина испод криве			Праћени параметри		
Параметар	Површина (95% Интервал поверења)	<i>p</i>	Вредност пресека <i>Cutoff value</i>	Осетљивост <i>Sensitivity</i> (%)	Специфичност <i>Specificity</i> (%)
<i>OCP</i>	0,667 (0,406-0,928)	0,201	355,58	65	58,3
<i>OHP</i>	0,815 (0,620-1,000)	0,016	130,30	78	75
<i>OFP</i>	0,120 (0,000-0,278)	0,004	63,35	22	25

OCP – укупни коагулациони потенцијал; **OHP** – укупни хемостатски потенцијал; **OFP** – укупни фибринолитички потенцијал.

Анализа параметара *ROC* криве код пацијенткиња са РАГрафик 35. *ROC* крива код пацијенткиња РА

На основу анализе *ROC* криве може се рећи да се сматра да су очекиване вредности глобалних метода хемостазе код жена са РА изнад:

$$OHP > 119,38 (p < 0,05)$$

$$OFP > 57,45 (p < 0,05).$$

За *OCP* није показана статистичка значајност.

Вредности праћених параметара приказани су у табели 42.

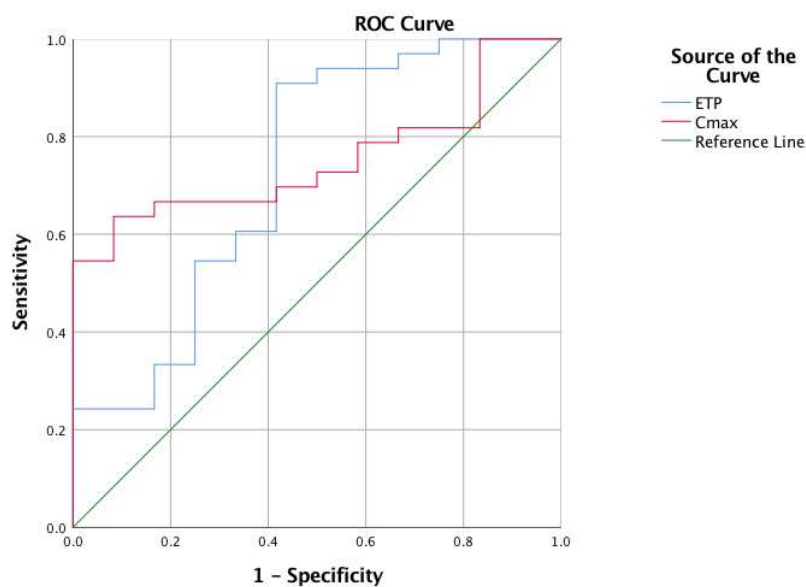
Табела 42. Вредности параметара *ROC* криве праћених код жена са РА.

Пацијенткиње са РА					
Површина испод криве			Праћени параметри		
Параметар	Површина (95% Интервал поверења)	<i>p</i>	Вредност пресека <i>Cutoff value</i>	Осетљивост <i>Sensitivity</i> (%)	Специфичност <i>Specificity</i> (%)
<i>OCP</i>	0,585 (0,439-0,730)	0,247	331,45	80	38
<i>OHP</i>	0,644 (0,488-0,800)	0,049	119,38	81	43
<i>OFP</i>	0,337 (0,185-0,489)	0,026	57,45	67	33

OCP – укупни коагулациони потенцијал; **OHP** – укупни хемостатски потенцијал; **OFP** – укупни фибринолитички потенцијал.

4.4.6.2. Ендогени тромбин потенцијал

Статистичка значајност за ендогени тромбин потенцијал показана је само у контролној групи жена у менопаузи. У осталим групама и подгрупама није показана статистичка значајност.

Анализа параметара *ROC* криве код здравих жена у менопаузиГрафик 36. *ROC* крива код здравих жена у менопаузи

На основу анализе *ROC* криве може се рећи да се сматра да су очекиване вредности ендогеног тромбин потенцијала код здравих жена у менопаузи изнад:

ETP AUC > 90,51 ($p < 0,05$)

ETP Cmax > 104,55 ($p < 0,05$).

Вредности праћених параметара приказани су у табели 43.

Табела 43. Вредности параметара *ROC* криве праћених код здравих жена у менопаузи.

Контроле у менопаузи					
Површина испод криве			Праћени параметри		
Параметар	Површина (95% Интервал поверења)	p	Вредност пресека <i>Cutoff value</i>	Осетљивост <i>Sensitivity</i> (%)	Специфичност <i>Specificity</i> (%)
<i>ETP AUC</i>	0,727 (0,543-0,912)	0,021	90,51	91	58
<i>ETP Cmax</i>	0,753 (0,613-0,892)	0,010	104,55	70	58

ETP AUC – мерење укупног ендогено генерисаног тромбина представљено као површина испод криве; ***ETP C_max*** – максимална концентрација тромбина

На основу *ROC* крива, може се рећи да је већа специфичност и сензитивност показана праћењем укупног хемостатског потенцијала у односу на ендогени тромбин потенцијал. Овакви резултати указују да параметри глобалних метода хемостазе могу бити корисни у дијагностиковању и праћењу хиперкоагулационог стања код пацијената са РА.

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

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

Вредности параметара који прате време лизирања угрушка приказане су у табели 44.

Табела 44. Вредности параметара који прате време лизирања угрушка у контролној и експерименталној групи.

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

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

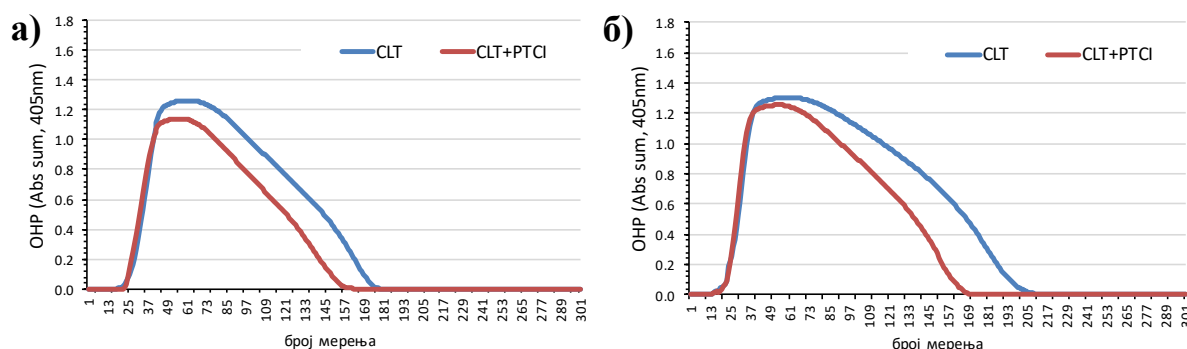


График 37. Репрезентативне криве времена фибринолизе угрушка (*CLT*) са и без додатка PTCl. Укупни фибринолитички потенцијал код контрола и пацијената са РА. CLT – време лизирања угрушка; PTCl – инхибитор карбоксипептидазе. а) – контрола; б) – пацијент.

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

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

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

Вредности параметара који прате време лизирања угрушка као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 45.

Табела 45. Вредности параметара који прате време лизирања угрушка у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

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

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

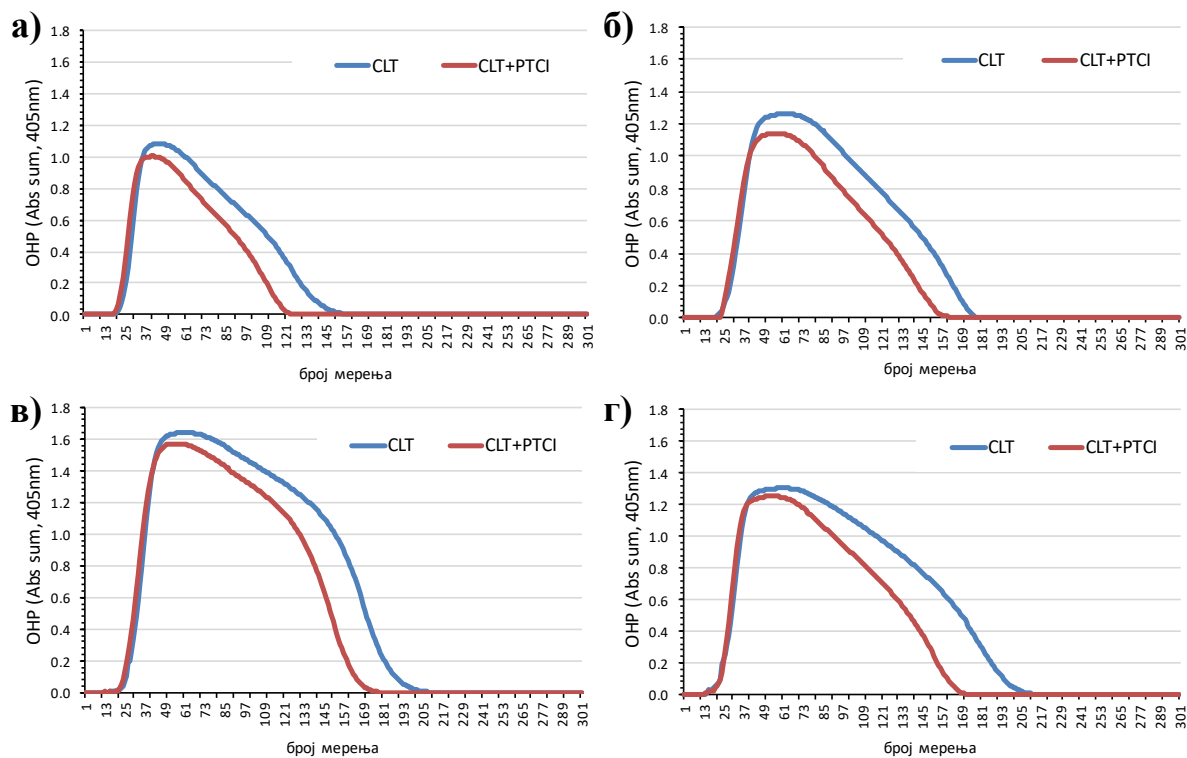


График 38. Репрезентативне криве времена фибринолизе угрушка (CLT) са и без додатка PTCl. Укупни фибринолитички потенцијал код контрола и пацијената са РА. CLT – време лизирања угрушка; PTCl – ихнибитор карбоксипептидазе. а) – пременопаузална контрола; б) – менопаузална контрола; в) – пременопаузални пацијент; г) – менопаузални пацијент.

4.4.9. Турбидиметрија – анализа параметара фибринског угрушка и његове структуре

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

Вредности параметара турбидиметрије као и статистичке значајности приказане су у табели 46.

Табела 46. Вредности параметара турбидиметрије у контролној и експерименталној групи.

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

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

4.4.10. Утицај менопаузе на параметре турбидиметрије

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

Вредности које прате параметре турбидиметрије као и статистички значајна разлика између подгрупа приказане су у табели 47.

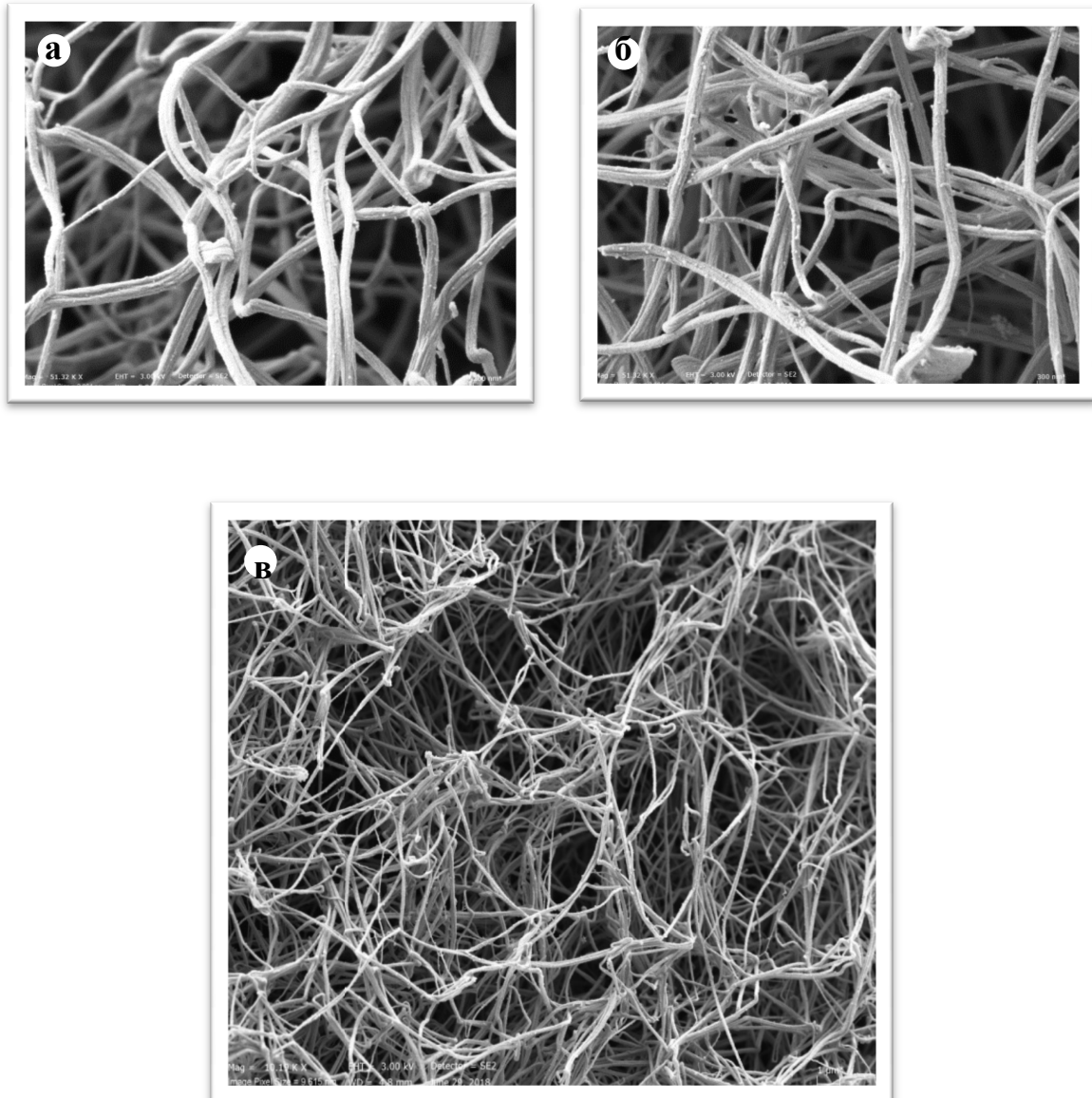
Табела 47. Вредности које прате параметре турбидиметрије у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

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

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

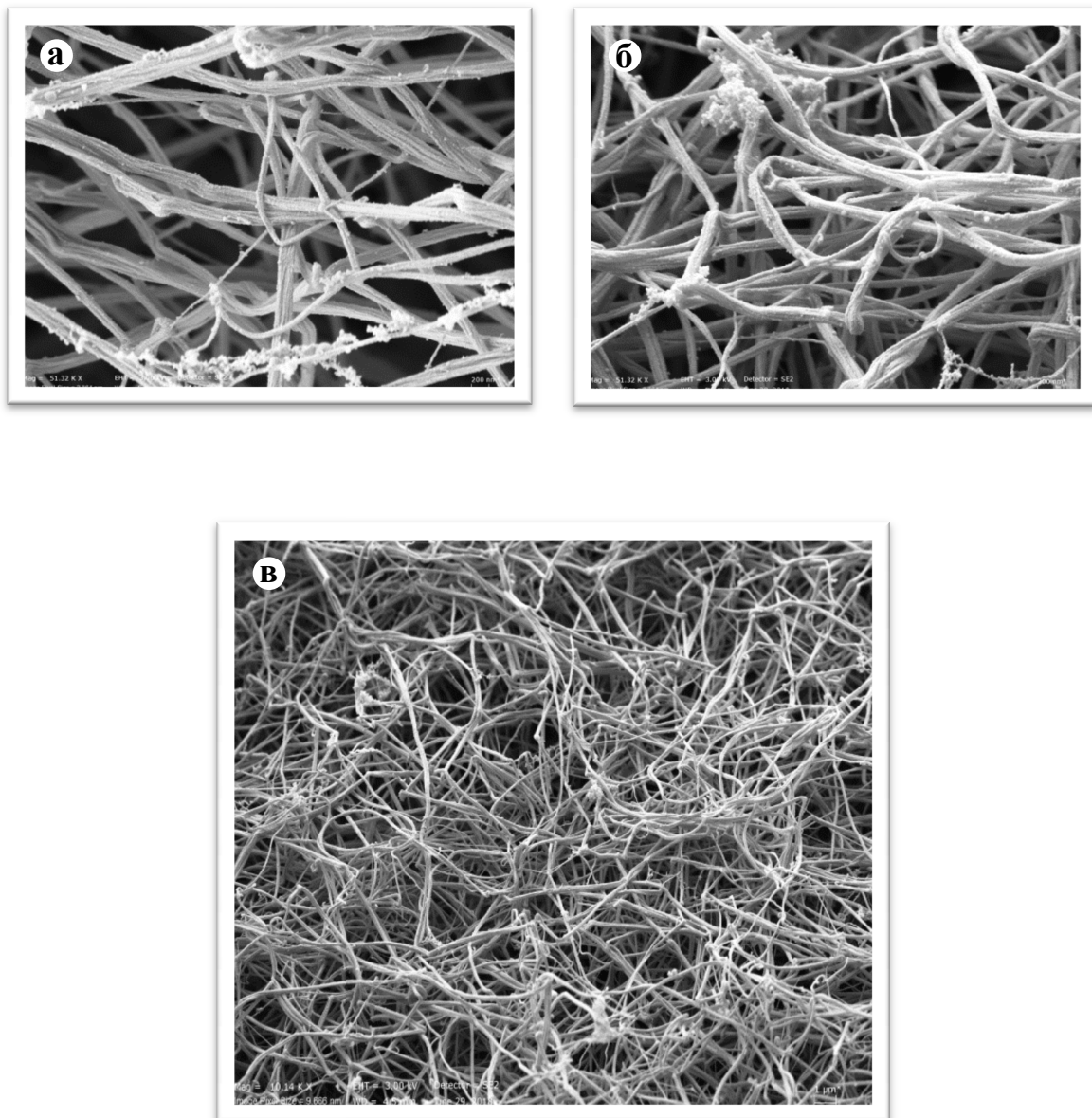
4.5. Електронска микроскопија

4.5.1. Контрола у пременопаузи



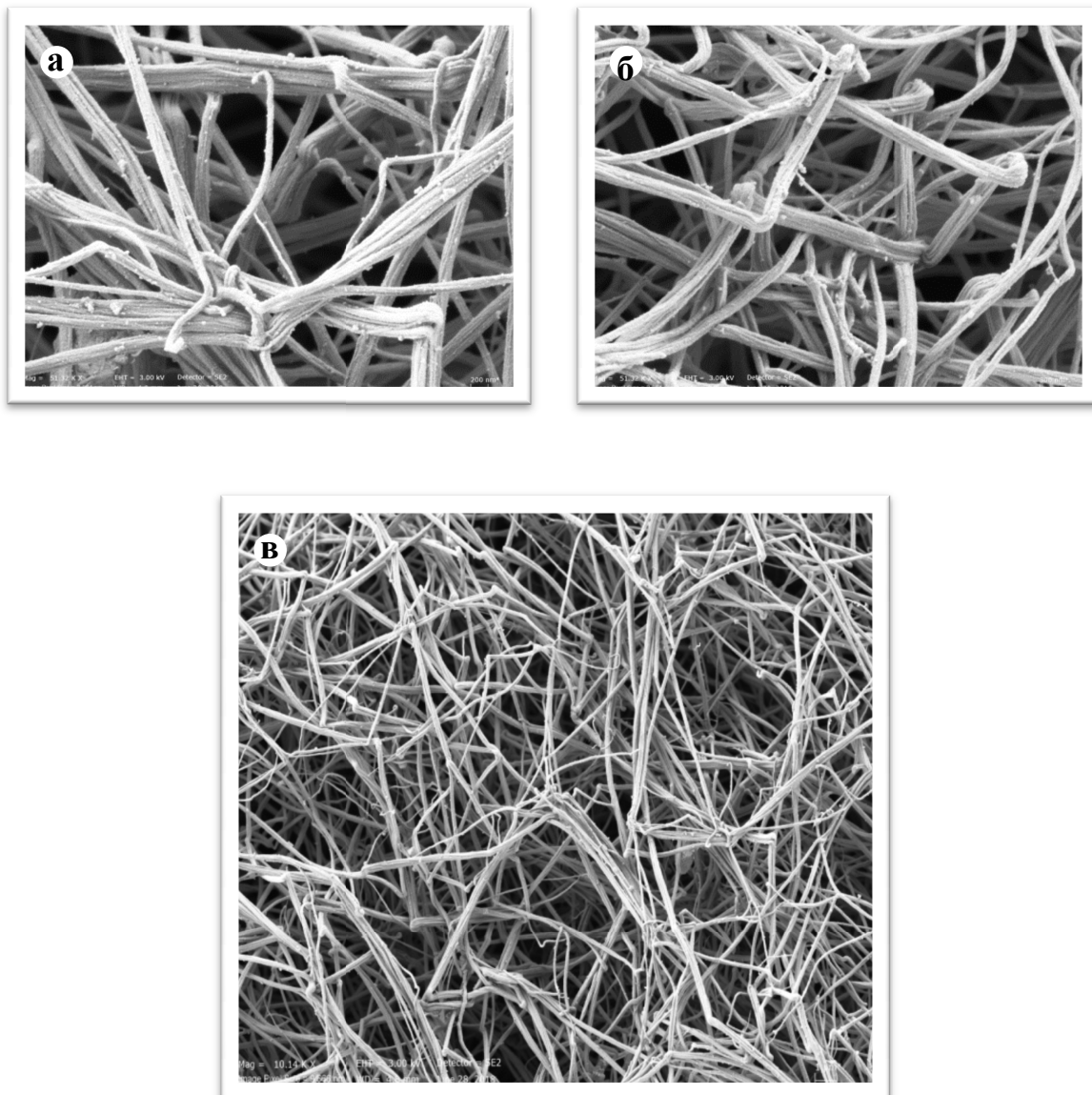
Слика 5. Електронска микроскопија репрезентативног фибринског угрушка у контролној пременопаузалној групи. **а** – увећење 200 nm; **б** – увећење 300 nm; **в** – увећење 1 μm.

4.5.2. Контрола у менопаузи



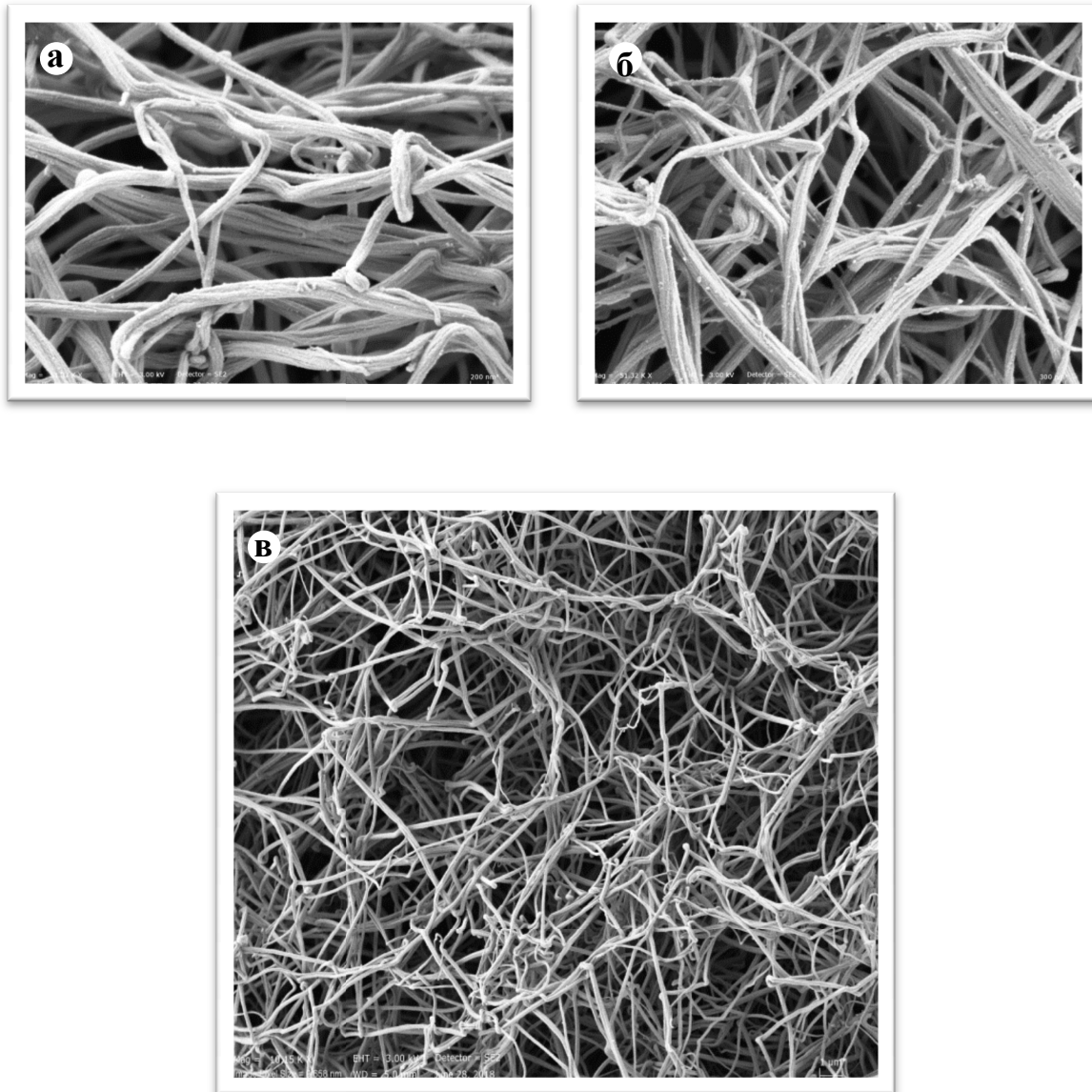
Слика 6. Електронска микроскопија репрезентивног фибринског угрушка у контролној менопаузалној групи. **а** – увећење 200 nm; **б** – увећење 300 nm; **в** – увећење 1 μ m.

4.5.3. Пацијенткиња у пременопаузи



Слика 7. Електронска микроскопија репрезентативног фибриноског угрушка у пременопаузалној групи пацијенткиња са реуматоидним артритисом. **а** – увећење 200 nm; **б** – увећење 300 nm; **в** – увећење 1 μm.

4.5.4. Пацијенткиња у менопаузи



Слика 8. Електронска микроскопија репрезентативног фибриноског угрушка у менопаузалној групи пацијенткиња са реуматоидним артритисом. **а** – увећење 200 nm; **б** – увећење 300 nm; **в** – увећење 1 μ m.

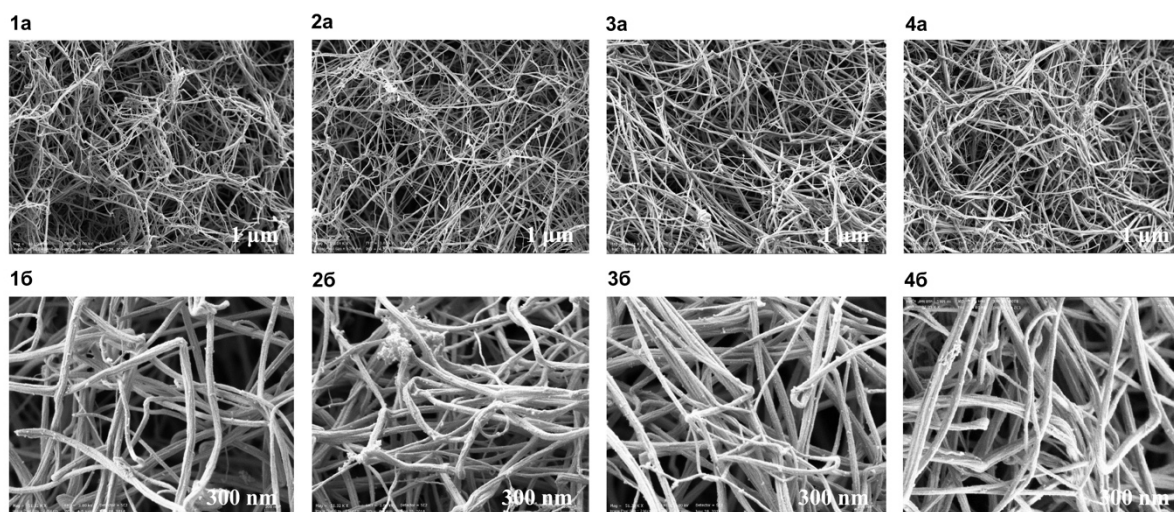
Резултати електронске микроскопије указују на веће поре код пременопаузалних контрола са мањом густином, такозвана “*looser*” структура, која је више осетљива на фибринолизу (Слика 9; 1а-б). Постменопаузалне контроле (Слика 9; 2а-б) и обе групе пацијената са РА, пременопаузална (Слика 9; 3а-б) и постменопаузална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

Дебљина влакана у контролној и експерименталној групи приказана је у табели 48.

Табела 48. Дебљина влакана у контролној и експерименталној групи посматрани у односу на менопаузу.

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

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација.



Слика 9. Упоредни приказ репрезентативних фибринских угрушака снимљених електронском микроскопијом код испитаника у студији. **1** – пременопаузална контрола; **2** – менопаузална контрола; **3** – пременопаузални пацијент; **4** – менопаузални пацијент. Увећење **1μm**: 1-4а и **300nm**: 1-4б.

4.6. Редокс статус

4.6.1. Параметри оксидационог стреса

Вредности параметара оксидационог стреса (H_2O_2 , O_2^- , NO_2^- , TBARS), код здравих жена и пацијената са РА, приказане су у табели 49, док су вредности наведених параметара праћени на основу менопаузе, приказане у табели 50.

Табела 49. Вредности параметара оксидационог стреса у контролној и експерименталној групи.

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

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

Табела 50. Вредности параметара оксидационог стреса у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе.

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

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

4.6.1.1. Водоник-пероксид (H_2O_2)

Вредности водоник пероксида биле су ниже код здравих контрола у односу на пацијенте са РА са статистички значајном разликом ($p < 0,01$) (График 39).

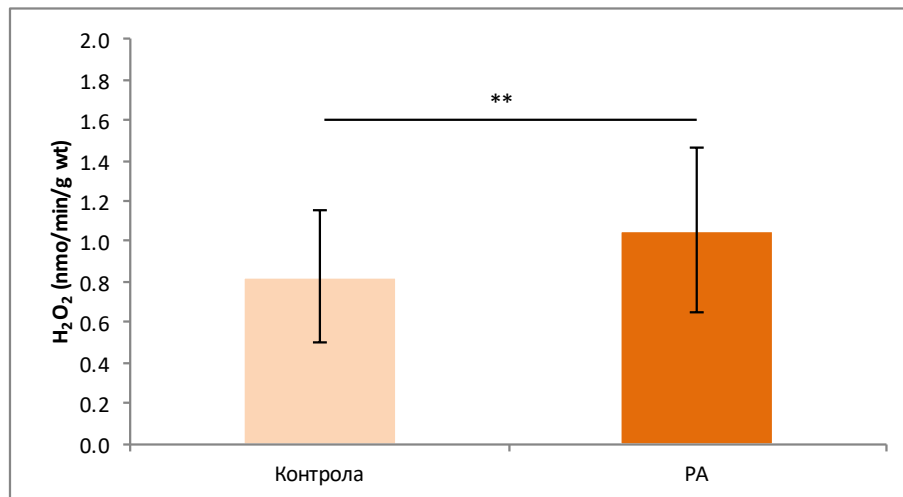


График 39. Вредности-водоник пероксида у контролној и експерименталној групи.

Вредности овог параметра праћене на основу менопаузе, показале су значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пременопаузи имале су статистички значајно мање вредности од пацијенткиња у пременопаузи ($p < 0,01$) и у менопаузи ($p < 0,01$). Вредности водоник пероксида биле су значајно мање у контролној групи у менопаузи у односу на пременопаузалне ($p < 0,01$) и пацијенткиње у менопаузи ($p < 0,01$) (График 40).

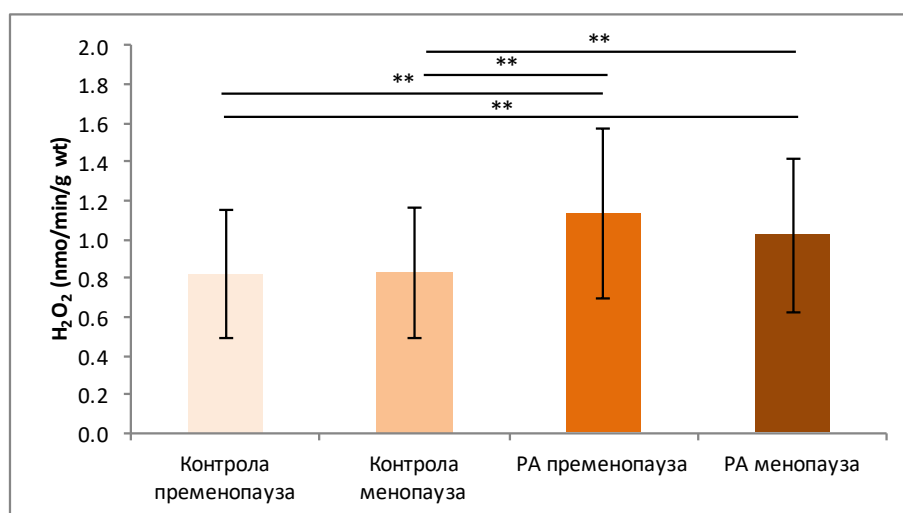


График 40. Вредности водоник-пероксида у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.1.2. Супероксид анјон радикал (O_2^-)

Вредности супероксид анјон радикала се нису статистички значајно разликовале између посматраних група (График 41).

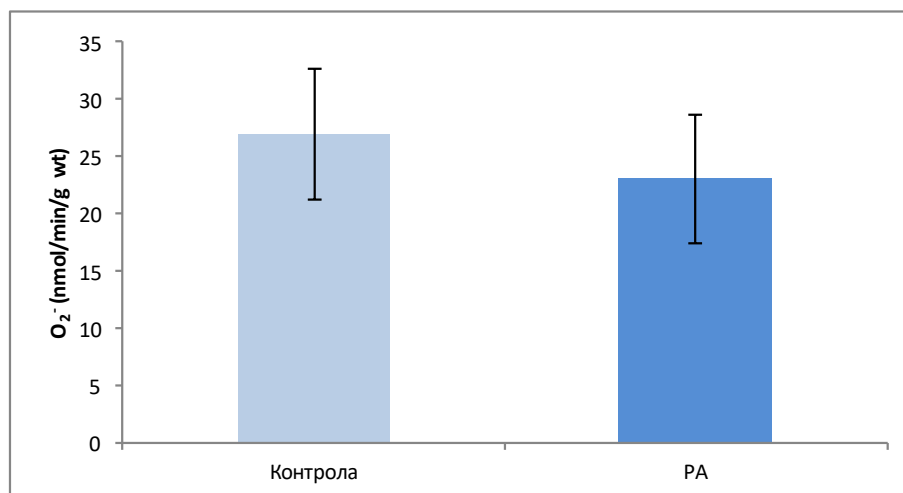


График 41. Вредности супероксид анјон радикала у контролној и експерименталној групи.

Вредности супероксид анјон радикала се нису статистички значајно разликовале између посматраних подгрупа, подељених на основу менопаузе (График 42).

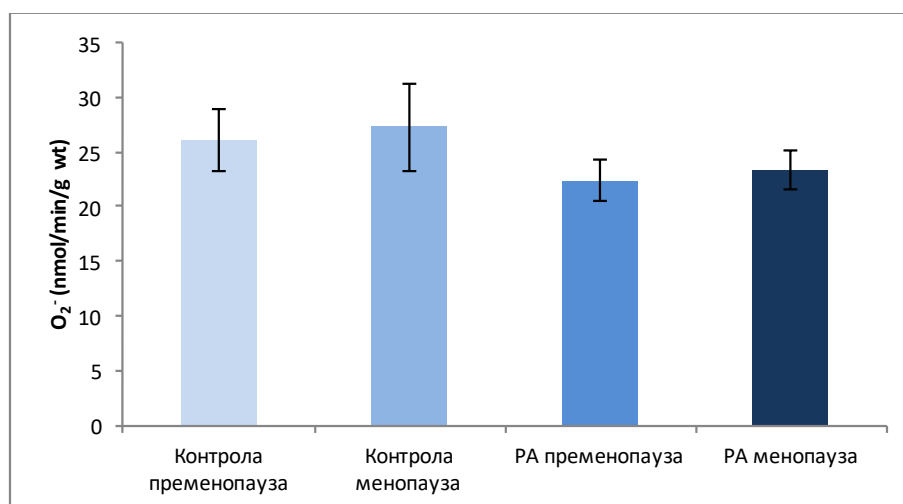


График 42. Вредности супероксид анјон радикала у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.1.3. Нитрити (NO_2^-)

Вредности нитрита су биле значајно повишене у групи здравих испитаника и поређењу са пацијентима ($p < 0,01$) (График 43).

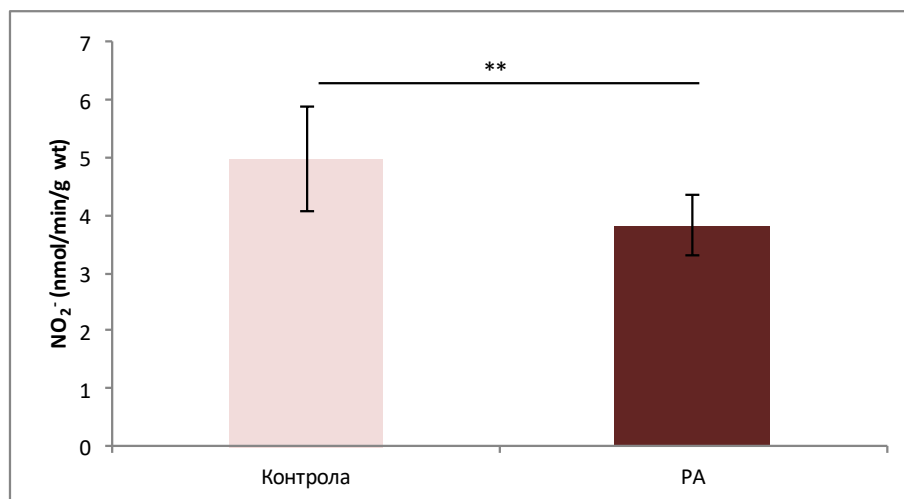


График 43. Вредности нитрита у контролној и експерименталној групи.

Вредности овог параметра праћене на основу менопаузе, показале су значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пременопаузи имале су статистички значајно више вредности од пацијенткиња у пременопаузи ($p < 0,01$) и у менопаузи ($p < 0,01$). Вредности нитрита биле су значајно више у контролној групи у менопаузи у односу на пацијенткиње у менопаузи ($p < 0,01$) (График 44).

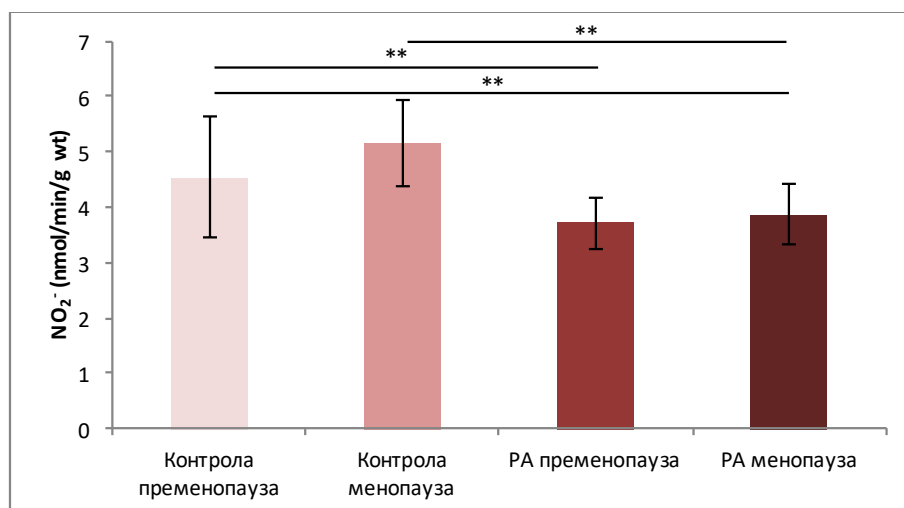


График 44. Вредности нитрита у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.1.4. Индекс липидне пероксидације (TBARS)

Вредности индекса липидне пероксидације биле су ниже код здравих испитаника у поређењу са пацијентима ($p < 0,01$) (График 45).

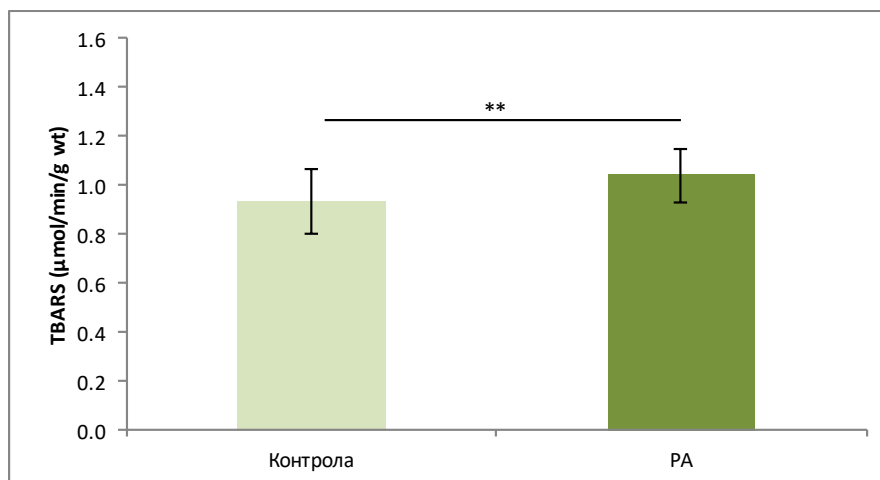


График 45. Вредности индекса липидне пероксидације у контролној и експерименталној групи.

Вредности овог параметра праћене на основу менопаузе, показале су значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пременопаузи имале су статистички значајно мање вредности од пацијенткиња у пременопаузи ($p < 0,05$) и у менопаузи ($p < 0,05$). Вредности индекса липидне пероксидације биле су значајно мање у контролној групи у менопаузи у односу на пременопаузалне ($p < 0,01$) и пацијенткиње у менопаузи ($p < 0,01$). Поред тога, показана је статистичка значајност између контролних група ($p < 0,05$) (График 46).

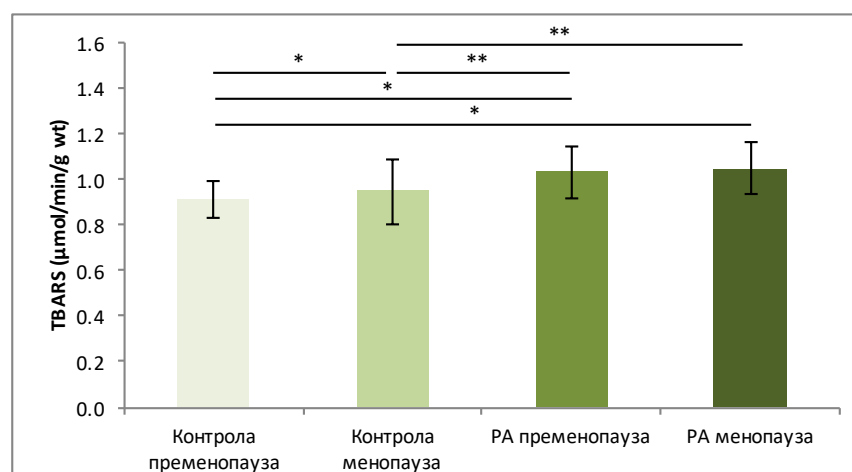


График 46. Вредности индекса липидне пероксидације у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.2. Параметри антиоксидационе заштите

Активност параметара антиоксидационе заштите (SOD, CAT, GSH), код здравих жена и пацијената са РА, приказана је у табели 51, док је активност наведених параметара праћена на основу менопаузе, приказана су у табели 52.

Табела 51. Активност параметара антиоксидационе заштите у контролној и експерименталној групи.

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

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b 1 и 3; ^c 1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности *p<0,05; **p<0,01.

Табела 52. Активност параметара антиоксидационе заштите у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе.

Параметар	(1) Контрола пременопауза	(2) Контрола менопауза	(3) РА пременопауза	(4) РА менопауза
CAT (U/gHbx10 ³)	2,96 ± 0,85	3,49 ± 0,76	3,73 ± 0,70	2,87 ± 0,74
SOD (U/gHbx10 ³)	21,51 ± 6,85 ^{c**}	24,42 ± 6,73 ^{d*, e**}	16,28 ± 6,31	13,13 ± 6,87
GSH (nmol/ml RBCs)	73871,92±7281,67	75164,88±9510,46	70699,51±7548,23	69500,72±8912,88

Вредности су представљене као средња вредност ± стандардна девијација. Статистичка значајност између група: ^a1 и 2; ^b 1 и 3; ^c 1 и 4; ^d2 и 3; ^e2 и 4; ^f3 и 4 са нивоом значајности *p<0,05; **p<0,01.

4.6.2.1. Каталаза (CAT)

Активност каталазе је статистички значајно била већа у контролној групи у поређењу са пацијентима ($p < 0,05$) (График 47).

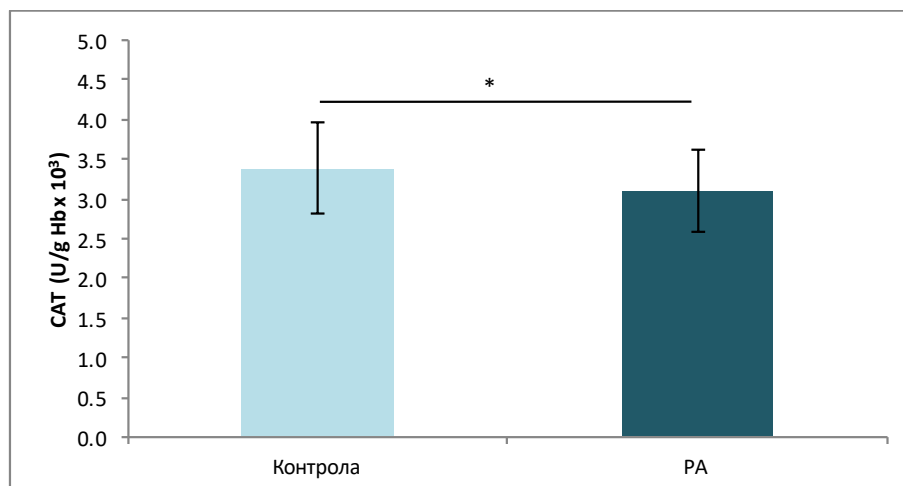


График 47. Активност каталазе у контролној и експерименталној групи.

Активност каталазе се није статистички значајно разликовала између посматраних подгрупа, подељених на основу менопаузе (График 48).

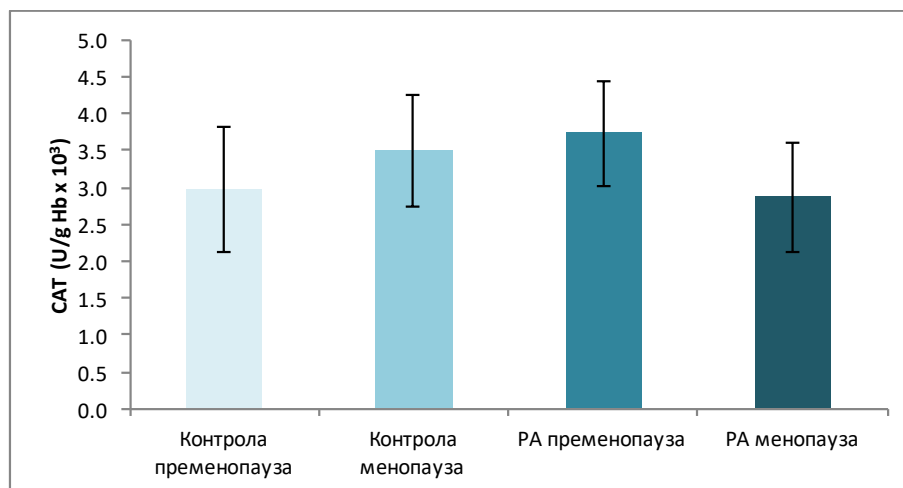


График 48. Вредности активности каталазе у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.2.2. Супероксид-дисмутаза (SOD)

Статистички значајно већа активност супероксид-дисмутазе примећена је код здравих жена у поређењу са пацијенткињама са РА ($p < 0,05$) (График 49).

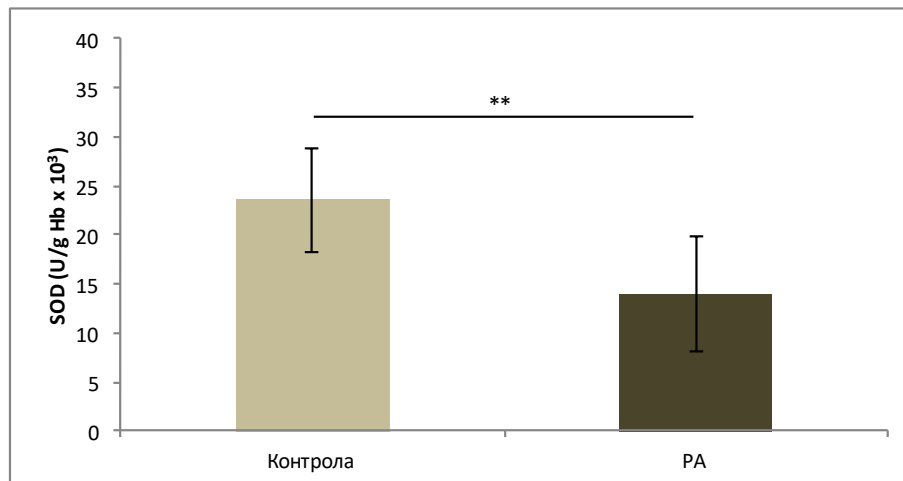


График 49. Активност супероксид-дисмутазе у контролној и експерименталној групи.

Активност овог параметра праћена на основу менопаузе, показала је значајне разлике између посматраних подгрупа. Здраве жене у пременопаузи имале су статистички значајно више вредности од пацијенткиња у менопаузи ($p < 0,01$). Активност супероксид-дисмутазе била је значајно већа у контролној групи у менопаузи у односу на пременопаузалне ($p < 0,05$) и пацијенткиње у менопаузи ($p < 0,01$) (График 50).

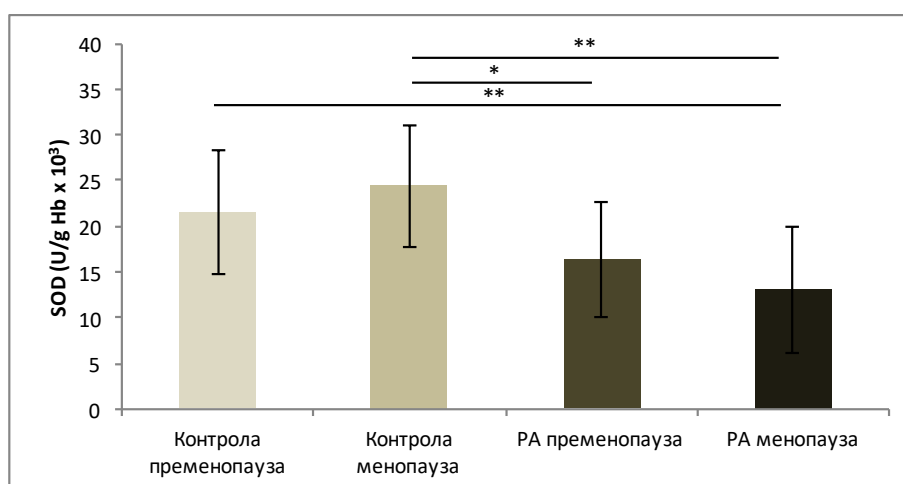


График 50. Вредности супероксид-дисмутазе у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.6.2.3. Редуковани глутатион (GSH)

Вредности редукованог глутатиона нису се значајно разликовале између здравих жена у поређењу са пацијенткињама са РА (График 51).

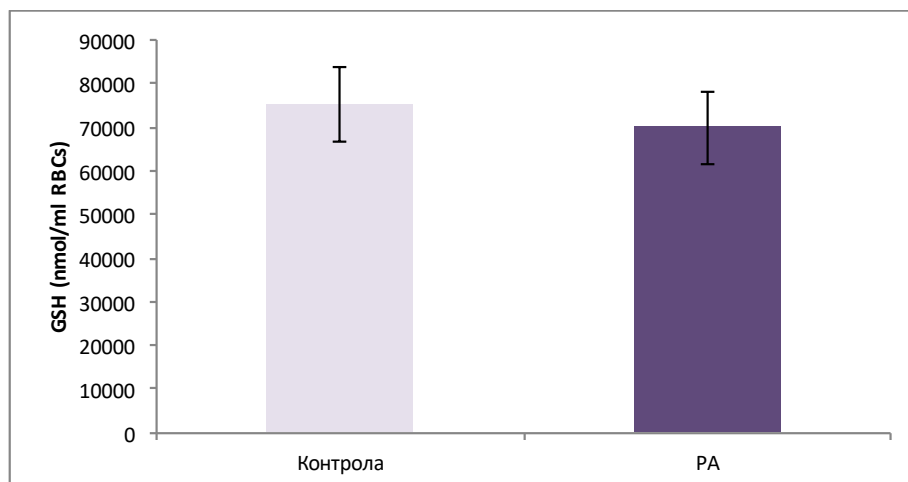


График 51. Вредност редукованог глутатиона у контролној и експерименталној групи.

Вредност редукованог глутатиона се није статистички значајно разликовала између посматраних подгрупа, подељених на основу менопаузе (График 52).

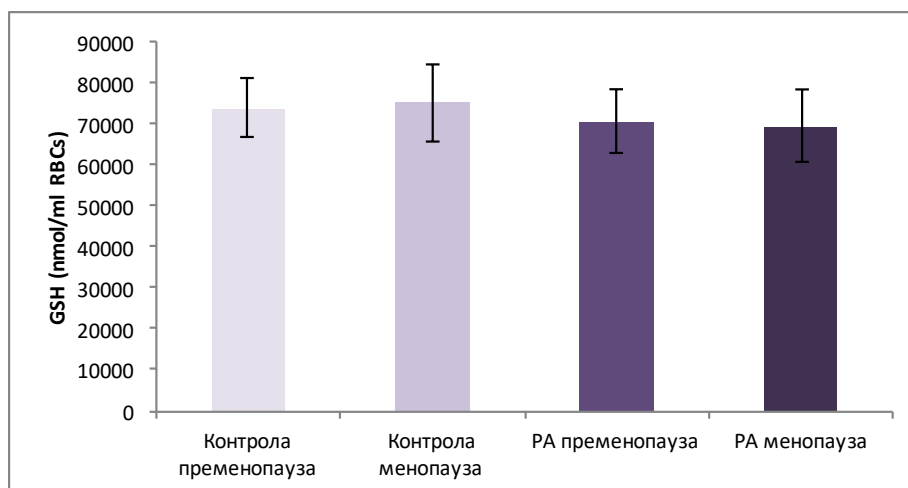


График 52. Вредности редукованог глутатиона у контролној и експерименталној групи на основу менопаузе

4.7. Корелација

Нивои укупног коагулационог потенцијала (ОСР) и укупног хемостатског потенцијала (ОНР) су у корелацији ($r = 0.54$; $p = 0.001$ и $r = 0.44$; $p = 0.003$, редом) са активношћу болести код пацијената са РА, мерено параметром DAS28 (График 53). Значајна корелација је такође примећена у вредностима неспецифичних параметара запаљења, Ц-реактивног протеина ($r = 0.45$; $p = 0.003$ за ОСР и $r = 0.46$; $p = 0.002$ за ОНР) и седиментације ($r = 0.65$; $p = 0.0001$ за ОСР и $r = 0.65$; $p = 0.0001$ за ОНР).

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

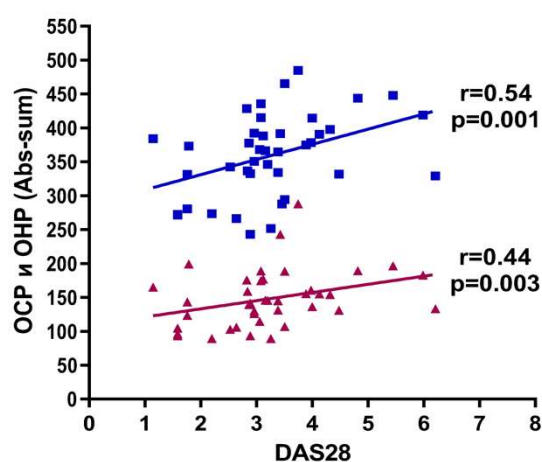


График 53. Корелација између укупног коагулационог потенцијала (ОСР) и укупног хемостатског потенцијала (ОНР) и активности болести код пацијената са РА (DAS28).

Укупни фибринолитички потенцијал (*OFP*) је у негативној корелацији са ΔCLT ($r = -0.47$, $p = 0.002$) код пацијената са РА, показујући да је поремећена фибринолиза повезана са повећаном *TAFI* активношћу (График 54).

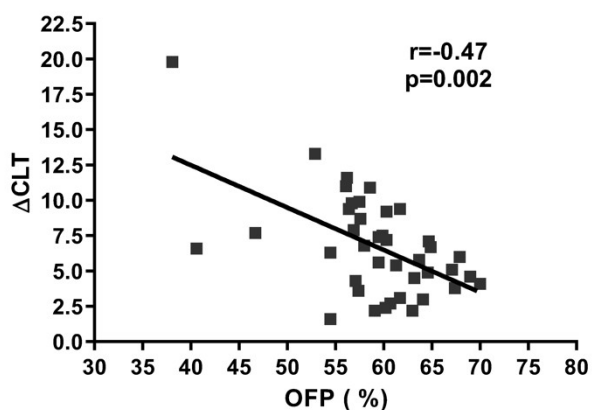


График 54. Корелација између укупног фибринолитичког потенцијала (*OFP*) и ΔCLT код пацијената са РА.

Табела 53. Корелације између активности реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе

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

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

Табела 54. Корелације између активности реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе у односу на менопаузу

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

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

Табела 55. Корелације између симптома реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе

Параметар	ББЗ		БОЗ	
ОСР	+0,409	p<0,01	+0,194	НЗ
ОНР	+0,270	НЗ	+0,221	НЗ
ОФР	-0,010	НЗ	-0,072	НЗ
FG MaxAbs	+0,059	НЗ	+0,068	НЗ
FG Slope	+0,342	p<0,05	+0,345	p<0,05
FG Slope time	-0,302	НЗ	-0,345	p<0,05
CLT без PTCl	-0,093	НЗ	-0,031	НЗ
CLT са PTCl	-0,045	НЗ	0,130	НЗ

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

Табела 56. Корелације између симптома реуматоидног артритиса и глобалних метода хемостазе у односу на менопаузу

Параметар	ББЗ		БОЗ	
Пременопаузалне жене са РА				
ОСР	+0,753	p<0,05	+0,658	p<0,05
ОНР	+0,383	НЗ	+0,452	НЗ
ЕТР Cmax	+0,587	НЗ	+0,720	p<0,05
FG Slope	+0,780	p<0,01	+0,753	p<0,01
FG Slope time	-0,728	p<0,05	-0,625	p<0,05
Постменопаузалне жене са РА				
ОСР	+0,247	НЗ	+0,031	НЗ
ОНР	+0,087	НЗ	+0,069	НЗ
ОФР	+0,012	НЗ	+0,272	НЗ
FG MaxAbs	-0,003	НЗ	-0,034	НЗ
CLT са РТСИ	-0,145	НЗ	+0,197	НЗ

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

Табела 57. Корелација између глобалних метода хемостазе и биохемијских и хематолошких параметара

Параметар	ОСР	р
ОНР	+0,837	p<0,01
ОФР	-0,675	p<0,05
АЛТ	+0,563	p<0,05
АСТ	+0,537	НЗ
Алкална-фосфатаза	+0,510	НЗ
Креатин-киназа	+0,672	p<0,05
Леукоцити	+0,625	p<0,05
Неутрофили (#)	+0,630	p<0,05
Моноцити (#)	+0,551	НЗ
Фибриноген	+0,717	p<0,05
АРТТ	+0,557	p<0,05
	ОНР	р
ОСР	+0,837	p<0,05
ОФР	-0,948	p<0,01
Леукоцити	+0,626	p<0,05
Лимфоцити (#)	+0,665	p<0,05
Фибриноген	+0,741	p<0,05
Седиментација	+0,739	p<0,01
Феритин	+0,702	p<0,01
Глобулини	+0,556	p<0,05
RDW	-0,666	p<0,05
Тромбоцити	+0,572	p<0,05
PCT	+0,627	p<0,05
PDW	-0,587	p<0,05
	ОФР	р
Фибриноген	-0,581	p<0,05

Вредности су представљене као Пирсонов или Спирманов коефицијент корелације. *p<0,05; **p<0,01. Јака позитивна корелација (0,50-1,00); позитивна умерена корелација (0,30-0,49); позитивна слаба корелација (0,10-0,29). **ОСР** – укупни коагулациони потенцијал; **ОНР** – укупни хемостатски потенцијал; **ОФР** – укупни фибринолитички потенцијал; **АСТ** – аспартат аминок-трансфераза; **АЛТ** – аланин аминок-трансфераза; **АРТТ** – активирано парцијално тромбoplastинско време; # - апсолутни број ћелија. **RDW** – мера варијабилности величине еритроцита (*red blood cell distribution width*); **PCT** – запремински удео тромбоцита у јединици пуне крви (*plateletcrit*); **PDW** – расподела тромбоцита по волумену (*platelet distribution width*); # - апсолутни број ћелија. Знак (+) означава позитивну корелацију; знак (-) означава негативну корелацију. Други биохемијски и хематолошки параметри нису показали корелацију, подаци нису представљени. **НЗ** – нема значајности.

V

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

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

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

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

Резултати нашег истраживања показали су код пацијената са РА повећање укупне концентрације микропартикула као и концентрације микропартикула које потичу од тромбоцита, моноцита, леукоцита, П-селектина. Глобалне методе хемостазе указују да коагулација може бити снажно погођена дуготрајном инфламацијом код пацијената са РА, и менопаузом код здравих жена. Резултати електронске микроскопије показали су да пацијенти са реуматоидним артритисом као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибриноског угрушка са мањим порама, који је мање осетљив на фибринолизу. Равнотежа редокс статуса код ових пацијената је нарушена у корист повећања прооксидационих и смањење активности антиоксидационих параметара, што указују на постојање оксидационог стреса у наведеној популацији. Губитак минералне густине костију био је присутан у свим подгрупама, осим код здравих контрола које нису у менопаузи. Сви неспецифични параметри инфламације били су повишени код пацијената са РА.

5.1. Утицај реуматоидног артритиса на микропартикуле

У првом делу студије испитивали смо концентрацију и врсту МП у популацији здравих жена и жена са дијагностикованим РА. Микропартикуле представљају хетерогену популацију, које се са површине плазма мембране углавном ослобађају активацијом ћелије или апоптозом. Иако је настанак микропартикула физиолошки одговор на активацију ћелија или ћелијску смрт, драматично повећање циркулишућих МП детектовано је у различитим стањима повезаним са тромбозом (139). Повишене вредности микропартикула у плазми, забележене су у метаболичким, кардиоваскуларним (акутни коронарни синдром, мождани удар, венски тромбоемболизам, васкулитиси, прееклампсија), инфективним (вирусни миокардитиси, сепса, дисеминована интраваскуларна коагулација), неопластичним и аутоимуним болестима као и код повреда (политрауме и опекотине) (59, 65, 140-145). Од аутоимуних болести, повишене вредности микропартикула пронађене су РА (74, 146), системској склерози (147, 148), Кроновој болести (149), мултиплој склерози (150), системском еритемском лупусу (151, 152), антифосфолипидном синдрому (153), васкулитису (154, 155) и миозитису (156).

Акутно и хронично запаљење се карактеришу повећаном концентрацијом МП у крви (65). Наши резултати указују на повећање укупне концентрације МП код пацијената оболелих од РА у односу на здраве испитанике као и повећану концентрацију МП које потичу од тромбоцита, моноцита, леукоцита и П-селектина. Такође, наши резултати су у сагласности са претходним истраживањима, која указују на повећање концентрације МП услед присуства инфламације или аутоимунских болести (57, 59, 71, 74). Поред тога, одговарајући терапијски третман може довести до смањења концентрације МП код пацијената са аутоимунским болестима (71).

Укупна концентрација микропартикула праћена је као концентрација свих ћелија позитивних на фосфатидилсерин, димензија између 0,1-1 μ m. Услед чињенице да потичу са мембрана ћелија, микропартикуле имају структуру која је заснована на фосфолипидима, односно на својој површини експримирају фосфатидилсерин и друге фосфолипиде (158). У зависности од порекла ћелије, МП носе остатке ћелија, цитоплазматске и нуклеарне компоненте и експримирају функционалне рецепторе и ћелијске антигене на површини (62, 158). С обзиром да на својој површини експримирају прокоагулантни фосфатидилсерин, за који се везују фактори коагулације VIII и V стереоселективним реакцијама, имају значајну улогу у хемостази, тромбози и

инфламацији (159, 160). Стимулација ћелија доводи до "расипања" фосфатидилсерина, и настанка МП богатих фосфатидилсерином. Фосфатидилсерин који је обично присутан на унутрашњој страни ћелијске мембране, у тренутку када ћелија подлеже апоптози, није више ограничен на цитосолни део мембране већ постаје изложен на површини ћелије. Фосфатидилсерин експримиран на микропартикулама представља адекватну клиничку платформу за активацију фактора коагулације доводећи до прокоагулантне активности (59, 161). Идентификација порекла МП је од виталног значаја јер указује на доминантни тип ћелија који је укључен у патолошко стање (162).

Као што је раније поменуто, тромбоцити имају значајну улогу у инфламацији и имуномодулацији. Улога тромбоцита у РА се односи на "комуникацију" између коагулације и инфламације (78). Након активације, тромбоцити са своје мембране ослобађају микропартикуле које садрже цитоскелетне протеине, мембранске рецепторе и сигналне молекуле (163). Тако настале микропартикуле могу да интерагују са леукоцитима и да доведу до запаљења у зглобовима или системске инфламације. Међутим, као што је раније наведено, све ћелије могу активацијом са своје мембране ослободити микропартикуле које имају исте особине као и ћелије од којих потичу.

Knijff-Dutmer и сарадници су показали да је ниво микропартикула које потичу од тромбоцита значајно већи од нивоа ових ћелија код здравих испитаника при чему је њихова концентрација у корелацији са активношћу болести (74). *Xue* и сарадници су пратили концентрацију микропартикула које потичу од тромбоцита у крви и синовијалној течности пацијената са РА, као и микропартикуле које потичу од П-селектина и трансмембранског протеина из породице фактора некрозе тумора (CD154). Концентрација микропартикула које потичу од тромбоцита била је значајно већа у крви пацијената са РА у односу на здраве контроле као и у односу на концентрацију ових молекула у синовијалној течности оболелих од ове болести. Исти тренд је примећен и код микропартикула које су позитивне на присуство CD154 антигена, који може бити експримиран на различитим ћелијама као што су тромбоцити, макрофаге, базофили и др. Резултати ове студије били су у корелацији са активношћу болести мереном параметром DAS28 али не и са седиментацијом, Ц-реактивним протеином, реума фактором нити са антителима на циклични цитрулисани пептид (164). Пацијенти са ван-зглобним манифестацијама имају већу концентрацију МП који потичу од тромбоцита у синовијалној течности у поређењу са пацијентима без ван-зглобних манифестација болести. У синовијалној течности, доминантне су МП које потичу од леукоцита и његових субпопулација док је у серуму ових пацијената преобладајуће

присутна популација МП које потичу од тромбоцита и леукоцита, у односу на пацијенте са остеоартритисом и здраве контроле (165). *Sellam* и сарадници су такође пронашли повећану концентрацију МП које потичу од тромбоцита у серуму пацијената са РА (59). Овакви резултати могу да указују на улогу МП које потичу од тромбоцита у системској инфламацији и имуномодулацији у РА као и њихову улогу потенцијалног биомаркера за праћење тромбоцитне реактивности, ризика за настанак тромбозе и убрзане атеросклерозе.

Комплексна улога МП које потичу од тромбоцита огледа се у њиховом ефекту да на циљним ћелијама могу стимулисати производњу проинфламаторних цитокина IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α и других проинфламаторних молекула директном лиганд-рецептор интеракцијом. Овакви цитокини активирају ћелије које учествују у запаљењу да стварају још више МП што доводи до настанка "позитивне повратне спреге" односно, што више МП имамо у циркулацији, више се МП ствара (65). Улога микропартикула које потичу од тромбоцита у инфламацији подржана је и чињеницом да могу да активирају неутрофиле (166).

Евалуација циркулишућих МП код аутоимунских болести, посебно МП које потичу од тромбоцита и ендотела, могу се користити као биомаркер за праћење васкуларног оштећења. Поред наведеног, могу имати улогу прогностичког фактора за идентификацију особа са већим ризиком за развој тромбозе, код којих би била потребна посебна превенција (153).

Активација тромбоцита представља саставни део запаљенског процеса. МП које потичу од тромбоцита се акумулирају на леукоцитима и активираним ендотелу на местима где постоји васкуларна повреда. Ове МП могу учествовати у интеракцијама између леукоцита везивањем П-селектина и П-селектин гликопротеин лиганда 1 (PSGL-1) (167). Концентрација МП које потичу од П-селектина била је значајно већа у популацији пацијената оболелих од РА у односу на здраве испитанике. Повишене вредности П-селектина у плазми у односу на здраве испитанике показане су у истраживању које су спровели *Ertenli* и сарадници. Пацијенти са тромбоцитозом и РА имали су значајно више вредности П-селектина у односу на пацијенте са нормалним вредностима тромбоцита и здраве контроле (168). Микропартикуле које на својој површини експримирају антигене који потичу од П-селектина, биле су значајно више присутне у крви пацијената са РА у односу на здраве контроле као и у односу на синовијалну течност пацијената са РА (164). *Pamuk* и сарадници такође су указали на

повећану експресију CD62P (169). Додатно, позитивна корелација између концентрације П-селектина у плазми и јутарње укочености и броја тромбоцита (168).

Експресија на површини ћелија, као и секреција П-селектина, индукована је активацијом тромбоцита. Представља важан адхезиони рецептор који је медијатор у адхезији тромбоцита и ендотелних ћелија за моноците и гранулоците који последично покрећу експресију ткивног фактора и интерлеукина-8 *in vitro* (170). Повећана експресија П-селектина, може да укаже на његову улогу у активацији коагулације. Такође, П-селектин као што је претходно поменуто, повезан је са активацијом тромбоцита, а активација тромбоцита доводи до повећања концентрације микропартикула које потичу од тромбоцита при чему ове микропартикуле могу имати важну улогу у инфламаторном процесу у РА (74). Међутим, литературни подаци указују и на мање експримирање овог молекула на МП у односу на његову солубилну форму, с обзиром на чињеницу да још увек није у потпуности познато да ли је П-селектин у плазми пацијената са РА експримиран на микропартикулама или је присутан као слободни протеин (171).

Концентрација микропартикула које потичу од леукоцита била је повишена у нашем истраживању у односу на вредности код здравих испитаника. *Michael* и његова истраживачка група указују на повећање ових МП у серуму пацијента са РА, што је у корелацији са нашим истраживањем. Концентрација CD45⁺ може бити повећана и на месту саме инфламације, односно у синовијалној течности пацијената са РА (165). Међутим, резултати истраживања *Sellam* и сарадника и *Mobarrez* и сарадника не указују на повишену концентрацију ових микропартикула у популацији пацијената оболелих од РА (59, 71). Један од разлога за непостојање разлике између концентрације МП које потичу од леукоцита у контролној и експерименталној групи може бити агрегација цркулишућих леукоцита и тромбоцита, која доводи до настанка комплекса леукоцита и тромбоцита и смањење концентрације праћених МП (172). МП које потичу од леукоцита могу да стимулишу експресију хемокина са проангиогенетским својствима CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 и CXCL8 преко синовијалних фибробласта (173).

Концентрација МП које потичу од Е-селектина није се значајно разликовала код пацијената оболелих од РА у односу на здраве испитанике. Ендотелна дисфункција, убрзана атеросклероза и повећан кардиоваскуларни морбидитет и морталитет код пацијената са РА показани су у великом броју студија (174). Системска инфламација у РА је праћена активацијом васкуларног ендотела (175). Ово између осталог доводи до

ослобађања ендотелних адхезионих молекула, интерцелуларног адхезионог молекула (ICAM-1), васкуларног адхезионог молекула (VCAM-1) као и Е-селектина са површине ендотелних ћелија. Будући да су услед повећане експресије ендотелних ћелија леукоцити регрутовани до артеријског субендотела, ово је веома важно како за убрзану атеросклерозу, тако и за ендотелну дисфункцију (176). *Hjeltnes* и сарадници су показали да примена метотрексата или комбинација метотрексата и инхибитора фактора некрозе тумора, може да доведе до смањена Е-селектина, при чему је доза метотрексата била иста као и у нашој студији, 15-25 mg недељно (174). Са друге стране, ранија истраживања указују на повећану концентрацију Е-селектина код пацијената са кратким трајањем болести, просечна дужина трајања болести је годину дана, и код пацијената код којих је вредност $DAS28 > 5,1$ (177). У нашој студији трајање болести било је знатно дуже, просечна дужина болести била је $12,81 \pm 8,00$ година, при чему је активност болести мерена $DAS28$ износила $3,75 \pm 1,09$.

Повећана концентрација микропартикула које потичу од ткивног фактора и које су позитивне на присуство фосфатидилсерина, није забележена у нашем истраживању. Различити подаци су доступни када је у питању ова врста микропартикула. CD142 може бити присутан на микропартикулама и захтева посебну пажњу с обзиром на чињеницу да ткивни фактор има веома важну улогу у коагулацији (178). Раније су се моноцити сматрали јединим типом ћелије која може да доведе до синтезе ТФ *de novo* (179). Касније је показана повезаност ткивног фактора и неутрофила, као и његово присуство на тромбоцитима (179). Резултати студије коју су спровели *Osterud* и сарадници, није показала повећану активност ТФ при чему један од могућих разлога мале активности ових микропартикула може бити недостатак фосфатидилсерина који је повезан са антигеном ТФ на мембрани микропартикула. Поред тога, замрзавање и одмрзавање немају утицај на активност ТФ (180). Такође, постоје студије које указују да повећана активност ТФ код здравих особа није пронађена у крви, али да је код тих особа формирана хемостатска "коверта" око крвних судова. ТФ се иначе у великим концентрацијама налази на местима на којима је ризик од озбиљних последица и крварења већи, односно спреман је да активира коагулацију када је интегритет крвног суда нарушен (181).

Наши резултати су показали значајно повећање концентрације МП које потичу од моноцита код пацијената са РА у односу на здраву популацију. Њихова улога у инфламацији огледа се у повећању експресије адхезионих молекула на циљним

ћелијама, активацијом NF-кВ транслокације у нуклеусу (173). Претходне студије указују да концентрација МП које потичу од моноцита, може бити смањена код неких аутоимунских болести након терапије која позитивно утиче на саме клиничке симптоме и прогресију болести (71).

У нашем истраживању пацијенти су били на стандардном протоколу лечења које укључује примену ниских доза кортикостероида и метотрексата. Показано је да је терапија метотрексатом удружена са смањеним ризиком за настанак кардиоваскуларних болести (182), док за утицај ниских доза глукокортикоида на ризик за настанак ових обољења, још увек не може да се изведе прецизан закључак (183). Претрагом литературе, за метотрексат није пронађен утицај на концентрацију микропартикула, међутим за друге имуносупресивне лекове и глукокортикоидну терапију могу се наћи различита мишљења о њиховом утицају на концентрацију микропартикула. Код неких аутоимунских болести као што је псоријаза, терапија блокаторима TNF α довела је до смањења МП који потичу од тромбоцита и ендотела а самим тим и до смањења кардиоваскуларног ризика (184). Када је у питању терапија глукокортикоидима, литературни подаци указују на опречне резултате. Код пацијената са можданим ударом, терапија овим лековима је смањила концентрацију МП које потичу од тромбоцита (185). Висока доза глукокортикоида значајно је смањила серумску концентрацију МП у студији коју су спровели *Gao* и сарадници, док су *Kang* и сарадници на анималном моделу дошли до потпуно супротних резултата. У случају остеонекрозе изазване применом високих доза глукокортикоида, дошло је до значајног повећања концентрације МП које потичу од тромбоцита и ендотела (186).

5.2. Утицај реуматоидног артритиса на хемостазу

У другом делу студије испитивали смо поремећај хемостазе код пацијената са РА, помоћу два глобална хемостатска есеја, као и структуру фибринског угрушка код ових пацијената. Сви резултати су поређени са резултатима добијеним анализом узорака здравих жена исте старости као и унутар група према менопаузи.

Према нашим сазнањима, ово је прва студија у којој су две глобалне хемостатске методе, ЕТР и ОНР, спроведене код пацијената са реуматоидним артритисом, поређене са контролном групом и праћене на основу менопаузе. Додатно, посматрано је време разградње угрушка, његова структура електронском микроскопијом, као и турбидиметријски параметри који прате особине фибринског угрушка код пацијента и здравих испитаника. Највећа предност нашег истраживања је опсежно испитивање хемостатских параметара у хомогеној групи пацијената са РА у поређењу са стриктно одговарајућим здравим испитаницима, као и праћење наведених група на основу менопаузе.

Аутоимуне болести мењају хемостатски баланс у корист повећања прокоагулационих и смањења антикоагулационих фактора (105). Инфламација у РА може повећати ризик за настанак кардиоваскуларних болести код пацијената са РА (16). Хиперкоагулационо стање може настати у физиолошком стању, у трудноћи, као и у патолошким стањима као што су прееклампсија (187), дијабетес (188), мождани удар (189, 190) и коронарна болест срца (187). Поред тога, хиперкоагулација је пронађена у многим аутоимуним болестима које у патогенези имају инфламацију (105), рекурентни венски тромбоемболизам (191) као и плућни емболизам (192).

Запаљење остаје важан ентитет у патогенези РА које доводи до поремећаја коагулације, повећане инциденце тромбозе, поремећаја опоравка ендотелних механизма, атеросклерозе и повећеног кардиоваскуларног ризика (193). Као што је поменуто раније, реуматоидни артритис као аутоимуна запаљенска болест, повећава ризик за настанак хиперкоагулационог стања (194).

Праћењем ендогеног тромбин потенцијала, у циљу процене настанка тромбина, између контролне и експерименталне групе није показана значајна разлика у количини тромбина, посматрана као површина испод криве као ни у максималној концентрацији насталог тромбина. Само неколико студија је пратило хемостатски баланс користећи глобалне хемостатске есеје. *Undas* и сарадници су истраживали капацитет генерисања тромбина при чему су указали на одложену и повећану концентрацију тромбина код

пацијената са РА, углавном захваљујући повећаним вредностима фактора коагулације VIII код ових пацијената (195). Супротно резултатима поменутог истраживања, Kern и сарадници показали смањене количине формираног тромбина у хомогеној групи пацијената са РА у поређењу са здравим контролама (196).

Синтеза тромбина је есенцијална за формирање фибрина при чему су мале количине тромбина потребне за почетак згрушавања. Измењена синтеза тромбина, повећана или смањена, може да доведе до хемостатске неравнотеже и измењеног тромботичког потенцијала (196). Медијатори запаљења утичу на антикоагулантне путеве, смањеном регулацијом настанка тромбомодулина и ендотелног рецептора за Ц протеин, смањујући активацију протеина Ц. Код запаљења, смањен ниво антитромбина може бити последица смањене синтезе, повећене разградње и потрошње и смањене синтезе гликозоминогликана. Смањена активност антитромбина доводи до одложене инхибиције ензима коагулације што за последицу има тенденцију настанка тромботичког стања (196). Унутар групе пацијената са РА, није примећена корелација између испитиваних параметара генерисања тромбина и активности болести, трајања болести или неспецифичних параметара запаљења као што су Ц-реактивни протеин и седиментација.

Вредности испитиваних параметара укупног хемостатског потенцијала (ОСР и ОНР) су у корелацији са активношћу болести код пацијената са РА. Есеј је заснован на агрегацији фибрина и фибринолизи, указујући на укупну количину насталог фибрина у испитиваним узорцима, уз његову осетљивост на фибринолизу. Формирање фибрина је финални продукт процеса коагулације али такође и веома важан у раној имунопатогенези РА у синовијама. Наиме, фибрин је најраспрострањенији антиген у синовијалном компартману који се може подвргнути цитрулинацији и да се понаша као аутоантиген. Стварање стабилне фибринске мреже је неопходно за контролу запаљеног процеса, с обзиром да се фибрински угрушак понаша као миграциони матрикс за различите типове ћелија, као што су макрофаги (197).

Активност болести мерена параметром DAS28 је у корелацији са трајањем болести и вредностима ОСР и ОНР, указујући на перзистентно хиперкоагулационо стање у целој РА групи. Овакав закључак може да се изведе услед чињенице да високе вредности ОНР и ОСР са смањеним OFP вредностима, указују на поремећену коагулацију у правцу хиперкоагулације (127). Пацијенти са већом активношћу болести, имали су веће вредности ОНР, праћене смањеним вредности OFP параметра (укупног фибринолитичког потенцијала), што може да укаже и на смањене концентрације

фибринолитичких фактора код пацијената са РА. Ови резултати су у сагласности са претходним студијама које су показале да РА, као аутоимуна инфламаторна болест, може довести до хиперкоагулационог стања, праћеног повећаним ризиком за настанак кардиоваскуларних болести, као што су венски тромбоемболизам, мождани удар и акутни инфаркт миокарда као и убрзаном атеросклерозом са повећаним морталитетом (42), при чему традиционални фактори ризика за настанак кардиоваскуларних болести могу делимично допринети њиховом настанку у РА (43). Међутим, као што је раније поменуто, између испитиваних група, здравих жена и пацијенткиња са РА није постојала разлика у погледу традиционалних фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести, као ни разлика у проценту кардиоваскуларних обољења, који би могли да утичу на овакав резултат.

5.3. Утицај менопаузе на хемостазу

Наши резултати указују на нижи ниво генерисаног тромбина као и нижу максималну концентрацију тромбина у пременопаузалним контролама у поређењу са постменопаузалним контролама и пацијентима. Пременопаузалне здраве жене имале су смањену концентрацију тромбина и фибрина, "looser" структуру фибринског угрушка као и појачану фибринолизу у поређењу са постменопаузалним здравим контролама. Вредности свих наведених параметара биле су више у популацији жена са РА. Међутим, разлике између пре- и постменопаузалних пацијената са РА престале су да постоје. Овакав резултат може да укаже на то да инфламаторни терет код пременопаузалних жена са РА активира хемостазу и затвара "gap", односно да разлика између пре- и постменопаузалних РА пацијената у погледу активације хемостазе нестаје.

Резултати нашег истраживања указују на повећану вредност ендогеног тромбин потенцијала у популацији здравих жена у постменопаузалном периоду у односу на жене пре менопаузе. Код жена које нису у менопаузи, мања реактивност тромбоцита је повезана са присуством естрогених рецептора на површини тромбоцита (248). Мања реактивност тромбоцита је удружена и са мањим ризиком за настанак кардиоваскуларних болести и хиперкоагулационог стања. Током постменопаузалног периода, генетски фактори и фактори околине (укључујући дијету, пушење, смањење физичке активности, инфламаторно стање ниског степена) "негативно" модулирају експресију протеина укључених у хемостазу, доводећи до промена у хемостатском

систему на различитим нивоима (васкуларном ендотелу, активности тромбоцита, коагулације крви, фибринолизе). Недостатак естрогена у постменопаузалном периоду доприноси прокоагулационом стању. Естрогени смањују одређене регулаторне коагулационе протеине (инхибитор ткивног фактора, протеин С, протеин Ц и антитромбин), при чему повећава прокоагулантне факторе VII, X, XII, и XIII и фрагменте протромбина. Оваква неравнотежа утиче на активацију коагулације (198). Смањењем регулаторних коагулационих протеина за антитромбин, повећава се концентрација тромбина у менопаузи.

У нашем истраживању, поремећај синтезе фибрина настао је и као последица менопаузе и као последица присуства саме болести односно инфламације. Уколико посматрамо здраве контроле у односу на менопаузу, забележене су значајно више вредности параметара ОНР и ЕТР есеја код жена у постменопаузи. Ови резултати могу да указују на менопаузом измењену коагулацију што је у сагласности са чињеницом да је кардиоваскуларни профил измењен код жена у менопаузи (199). Менопауза је у корелацији са повећаним кардиоваскуларним ризиком услед чињенице да велики утицај на кардиоваскуларни систем имају хормонске промене у менопаузи, као што је смањен ниво естрогена. Преваленца кардиоваскуларних болести код жена пре менопаузе је нижа у поређењу са женама у менопаузи. У менопаузи је примећен експоненцијални пораст кардиоваскуларних болести, који доводи до изједначења кардиоваскуларног ризика код жена и мушкараца до седамдесете године (200). Са овим подацима корелира чињеница да супституција хормонима води ка смањењу ризика за развој кардиоваскуларних болести (201). Додатно, ниво фактора коагулације у менопаузи расте, док се ниво антикоагуланаса смањује код здравих жена (198). Када говоримо о РА, ризик за почетак болести је повезан са менопаузом у ранијој животној доби (36). У случају раног настанка менопаузе, постменопаузални период је повезан са већом активношћу болести и бржом прогресијом инвалидитета (202, 203). Примећене промене у генерисању фибрина су важне и могу се сматрати значајним аспектом прокоагулационог стања у реуматоидном артритису.

Супротно од контролне групе, у експерименталној групи између пременопаузалних жена и жена у менопаузи није примећена статистички значајна разлика у параметрима глобалне хемостазе. Овакав резултат је у сагласности са претходно поменутиим, да инфламација код жена са РА које нису у менопаузи, активира хемостазу и доводи до хиперкоагулационог стања. У прилог овоме говори чињеница да између жена које нису у менопаузи и немају РА и жена исте доби са

дијагностикованим РА, постоји значајна разлика праћена укупним хемостатским и фибринолитичким потенцијалом. Равнотежа у популација жена са РА, које су у менопаузи, нарушена је у правцу настанка хиперкоагулационог стања. Такође, између пре- и постменопаузалних РА пацијената, затвара се ”*gap*”, односно нестаје разлика у погледу активације хемостазе. Не постоји значајна разлика у укупном коагулационом и фибринолитичким потенцијалу измеђе жена са РА пре менопаузе и у менопаузи. Ови резултати указују да и менопауза и РА имају велики утицај на коагулацију. Оба ентитета имају прокоагулациони ефекат.

Најважнија веза између коагулације и фибринолизе, која дозвољава синхронизацију ова два система, јесте инхибитор фибринолизе (ТАFI) (99). У нашој студији, пратили смо исход након додавања РТСI, инхибитора ТАFI, како бисмо испитали утицај РА на фибринолизу. Фибринолиза је физиолошки процес разградње тромба који обезбеђује важан баланс у хемостази. Поремећаји фибринолитичких путева су повезани или са развојем тромба (ослабљеном фибринолиза) или, у мањој мери, крварењем (прекомерном фибринолизом). Ослабљена фибринолиза је забележена код пацијената са аутоимуним болестима и може допринети развоју хиперкоагулационог стања и самим тим последично доводи до повећања ризика за настанак тромбозе (204). Недостатак инхибитора фибринолизе, РТСI, довео је до продужене фибринолизе у постменопаузалној контролној групи и обе РА групе. Додавање РТСI, као исход имао је најкраће време разградње угрушка у пременопаузалним контролама и најдуже време разградње код жена у менопаузу са РА. Продужено време разградње угрушка код пацијента са РА забележено је у претходној студији при чему није праћена разлика на основу менопаузе (205). У нашој студији и менопауза и болест је утицала на ослабљену фибринолизу.

Поред горе наведеног, резултати глобалних метода хемостазе у нашем истраживању су у корелацији са резултатима електронске микроскопије који указују да су све испитиване подгрупе имале гушћу структуру фибринског угрушка са мањим порама у односу на здраве жене које нису биле у менопаузи. У пременопаузалној контроли, примећене су веће поре са мањом густином. Угрушак са већим порама и мањом густином је више осетљив на фибринолизу (206) (детаљније о структури фибринског угрушка биће дискутовано у следећем поглављу). Ови резултати су потврђени вредностима ΔCLT (разлика између вредности времена разградње угрушка са додатком и без РТСI), које је показало продужену фибринолизу у свим подгрупама, у поређењу са пременопаузалним контролама. Продужено време лизе угрушка, заједно

са повећаним ОСР и ОНР и смањеним OFP, удружено је са хиперкоагулационим стањем (207).

5.4. Утицај реуматоидног артритиса и менопаузе на фибрински угрушак

Резултати нашег истраживања указују на неповољно измењену фибринску мрежу и морфологију влакана фибриноског угрушка код пацијената са РА као и код здравих контрола у менопаузи. Употребом електронске микроскопије, показали смо да пацијенти са РА као и здраве контроле у менопаузи имају гушћу структуру фибриноског угрушка са мањим порима. Исти резултати су примећени у претходној студији, где су поре мањих величина нађене код пацијената са реуматодним артритисом у поређењу са контролном групом (205). Наши резултати такође корелирају са студијом *Pretorius* и сарадници у којој су истраживачи пронашли да пацијенти са РА у поређењу са здравим контролама граде експанзивну фибринску мрежу (208) при чему компактни фибрински угрушци, односно гушћа фибринска мрежа представља поремећену коагулацију манифестовану као резистенција на фибринолизу (209). Угрушци са гушћом и мање пермеабилном структуром и са тањим и гушће упакованим фибринским нитима, лизирају много спорије у односу на угрушке са порознијом структуром (210). Претходне студије показале су да се компактнији угрушци формирају код особа са кардиоваскуларним болестима или другим стањима удруженим са повећаним кардиоваскуларним ризиком (211, 212). Са друге стране, угрушци са гушћом структуром су пронађени код здравих испитаника у менопаузи у поређењу са здравим женама које нису у менопаузи. Објашњење оваквог резултата је у чињеници да је менопауза удружена са формирањем гушћих фибринских угрушака (213).

Формирање гушће структуре угрушка је повезана са повећаним ризиком за кардиоваскуларне болести и венски тромбоемболизам с обзиром да су овакви угрушци мање склони фибринолизи (212). Такође, менопауза може бити повезана са формирањем протромботичких фибринских угрушака (213). *Kwasny-Krochin* и сарадници су показали мању пермеабилност и гушћу структуру фибрина код пацијената са РА у поређењу са контролним узорцима (205). Према томе, ми смо пронашли неповољно измењену морфологију фибрина у реуматоидном артритису са компактном структуром, састављеном од тањих влакана и мањих унутрашњих пора, посебно када се пореди са пременопаузалним здравим контролама. Ови угрушци теже лизирају, што може да се рефлектује кроз смањен укупни фибринолитички потенцијал

– OFP и продужено време лизирања угрушка – CLT у испитиваним узорцима пацијената са РА. Додатно објашњење за смањену фибринолизу може бити повећана активност инхибитора фибринолизе (ТАFI) која је показана у нашој студији. Као што је раније поменуто, ТАFI – карбоксипептидаза Б је ензим који је укључен у комуникацију између коагулације и фибринолизе, али такође има важну улогу у запаљенском процесу као инхибитор комплемента. На анималном моделу аутоимуног артритиса, ТАFI испољава антиинфламаторни ефекат одвајањем финалног продукта каскаде комплемента C5a (101). Према томе, активација ТАFI услед повећане синтезе тромбина у РА са једне стране инхибира фибринолизу док са друге може да смањи инфламаторни терет у овој болести. Међутим, у нашем истраживању, активација ТАFI иде у корист инхибицији фибринолизе.

Kwasny-Krochin и сарадници су пронашли да пацијенти са РА имају краћу *lag* фазу која указује на брже формирање фибринског угрушка за разлику од нашег истраживања где су пацијенти имали дужу *lag* фазу у односу на контролу. Бржа стопа полимеризације фибрина, представљена као *lag* фаза, предвиђена је параметром *PAI-1* у реуматоидном артритису (214). Међутим, у нашем истраживању нисмо одређивали вредности *PAI-1* код пацијената са РА, што може бити предмет даљих истраживања. Са друге стране, овакав резултат може бити последица разлике у полу, годинама, трајању и активности болести између наших пацијената и пацијената у наведеној студији. Исти тренд виших максималних вредности апсорбанце у РА је примећен у истраживању које су спровели *Pretorius* и сарадници (208).

Поред поремећаја концентрације тромбина и фибрина, промена структуре фибринског угрушка је такође присутна код пацијената са РА и код здравих испитаника у менопаузи, што доводи до закључка да менопауза поред утицаја на коагулацију и фибринолизу такође утиче и на структуру фибринског угрушка.

5.5. Утицај реуматоидног артритиса на оксидациони стрес код жена

У трећем делу студије, испитивали смо ефекат реуматоидног артритиса на редокс статус жена односно баланс између прооксидационих и антиоксидационих параметара у наведеној популацији. Како је објашњено у уводном делу, оксидациони стрес представља неравнотежу која настаје услед повећане производње реактивних врста или услед њихове неадекватне равнотеже од стране антиоксидационог система. У нашем истраживању, вредности оксидационог стреса биле су повишене у групи жена

оболелих од реуматоидног артритиса у односу на здраве испитанике, док су вредности ензима антиоксидационе заштите биле мање у односу на здраву популацију.

Познато је да проинфламаторни медијатори као што су цитокини и простагландини имају значајну улогу у патогенези РА. Међутим, постоји снажан доказ да оксидациони стрес има додатни утицај кроз повећану продукцију реактивних кисеоничних врста на местима инфламације.

Одређивањем прооксидационих параметара (супероксид анјон радикала, водоник пероксида, азот монооксида у форми нитрита као и маркера оксидационог оштећења, мереног као TBARS) циљ је био да испитамо да ли долази до повећања вредности ових параметара, односно настанка оксидационог стреса услед присутне инфламације или менопаузе. Са друге стране, одређивањем маркера антиоксидационе заштите, пратили смо да ли долази до губитка толеранције система заштите у наведеним стањима.

NO је реактивна азотна врста коју у највећим проценту стварају макрофаги и представља важну компоненту у повећаним вредностима оксидационог стреса током инфламације и аутоимуности. Претходне студије су показале да је ниво NO значајно виши код пацијента са РА у поређењу са здравим контролама (112, 215). *Kundu* и сарадници су дошли до закључка да концентрација овог молекула зависи од места са којег је узорак изолован, односно концентрација NO се разликује у различитим биолошким течностима пацијената са РА. Ниво интрацелуларног NO је био је 1,56 пута већи у моноцитима изолованим из крви пацијената са РА у односу на концентрацију у моноцитима синовијалног инфилтратата или у периферној крви здравих испитаника (116).

Интересанто, у нашој студији, значајно повишене вредности нитрита примећене су код здравих контрола у поређењу са пацијентима који имају РА (График 43). Једно од могућих објашњења оваквих резултата је у чињеници да нитрити могу да реагују са супероксид анјон радикалом, при чему долази до стварања смртоносног пероксинитрита, који реагује са великим бројем биомолекула. Азот-моноксид (NO) настаје деаминацијом L-аргинина из азот-моноксид синтазе (216). Вредности азот-моноксида мерен као нитрити, показале су смањене концентрације нитрита код жена оболелих од РА. Смањење овог вазодилататора игра веома важну улогу у развоју кардиоваскуларних болести доводећи до пролиферације глатких мишића, инфламације и атерогених ефеката на васкулатуру (217, 218).

Додатно, постоји могућност да су највеће вредности NO на самом месту запаљења, у зглобовима. Још један важан извор NO представљају зглобни хондроцити и синовијални фибробласти. Током хроничне инфламације која погађа зглобове, различите врсте ћелија као што су неутрофили, лимфоцити, мастоцити и макрофаги могу да доведу до повећаног настанка NO (215). Током дугог трајања и високе активности болести, могуће је да је на месту настанка реактивних кисеоничних врста, у зглобовима у којима постоји запаљење, уједно долази до снажне и брзе реакције између NO и O_2^- и настанка пероксинитрита. Повећани нивои маркера за пероксинитрит и нитротирозин пронађени су у синовијалној течности пацијената са РА (216).

Поред тога, вредности O_2^- биле су смањене код пацијената са РА али без статистичке значајности (График 42). Ово такође може бити резултат претходно поменути реакције између нитрита и супероксид анјон радикала која за последицу има синтезу пероксинитрита, и која доводи до смањења концентрације ових реактивних молекула врста појединачно. O_2^- има полу-живот 10^{-6} секунде, док NO молекула има полу-живот од неколико секунди (219).

Примарно место за везивање реактивних кисеоничних врста су двоструке везе у полинезасићеним масним киселинама у мембранама ћелија, које повећавају липидну пероксидацију и доводе до оксидационих оштећења. Штетни нуспродукти који настају услед оксидационих оштећења, посредованих реактивним кисеоничним врстама, као што су TBARS и малондиалдехид (MDA), доводе до синтезе различитих продуката и оштећења ткива код пацијената са РА. MDA је примарни биомаркер оксидационог стреса и липидног оштећења изазваног слободним радикалима (220).

Одређивање малондиалдехида и TBARS-а, представља методе које се најчешће користе за праћење оксидационог стреса (221) и липидне пероксидације, као једног од процеса који настаје као последица деловања реактивних кисеоничних врста. Малондиалдехид настаје пероксидацијом линолеинске, арахидонске и еикозапентаенске киселине и као такав представља посебно токсичан алдехид (222). Последице липидне пероксидације могу бити смањење флуидности мембране и повећање њене пропустљивости за супстанце које у физиолошким условима пролазе само кроз јонске канале или посредством других мембранских протеина, инактивацију рецептора и ензима као и поремећај функције и структуре мембранских протеина (222).

Повећана липидна пероксидација потврђује присуство оксидационог стреса у реуматоидном артритису. *Vasanthi* и сарадници су показали значајно веће вредности MDA код пацијената са РА у поређењу са контролном групом (215). Исти тренд је примећен у студији *Desai* и сарадници, где је показано да средња вредност нивоа малоналдехида код здравих испитаника има ниже вредности у поређењу са пацијентима (223). Велики број студија указује на повишен ниво малоналдехида код пацијената са РА у поређењу са здравим испитаницима у различитим биолошким узорцима (118, 223, 224). *Pasupathi* и сарадници су показали да је ниво TBARS у плазми и еритроцитима значајно повшен код пацијената са реуматоидним артритисом у поређењу са контролама (225) иста као и *Veselinovic* и сарадници (226) чији резултати су у сагласности са нашим истраживањем.

Вредности H_2O_2 су биле статистички веће код пацијената у односу на здраве контроле (График 40). Овај резултат прати смањену активност каталазе код пацијената са РА, која настаје као последица примарне улоге каталазе у елиминацији H_2O_2 . Претходне студије у популацији пацијената са РА, показале су повишене вредности концентрације H_2O_2 у односу на здраву популацију испитаника што је у корелацији са нашим резултатима (112, 226).

Активности супероксид дисмутазе и каталазе, као ензима антиоксидационе заштите, биле су значајно веће у контролној групи у поређењу са експерименталном (Графици 49 и 47). Вредности GSH биле су веће у популацији здравих испитаника али без статистичке значајности (График 52). Ови ензими имају важну улогу у антиоксидационом систему заштите.

Каталаза има различиту улогу у физиолошким и патолошким стањима. У физиолошким условима, каталаза има мали афинитет за H_2O_2 (у поређењу са глутатион-пероксидазом) док у случајевима повећане концентрације H_2O_2 , афинитет каталазе за ову кисеоничну врсту расте (119). Глутатион-пероксидаза користи редуковани глутатион као донор водоника за метаболисање H_2O_2 до воде. Претходна истраживања показала су да је глутатион, главни тиолни антиоксиданс, важан антиинфламаторни медијатор (227). Два ензима антиоксидационе заштите, глутатион пероксидаза и каталаза су веома битна у регулацији метаболизма водоник-пероксида који у повећаним концентрацијама може довести до оштећења DNK, RNK као и липида. Улога SOD је у неутрализацији супероксид-анјон радикала, једне од главних кисеоничних врста које учествују у инфламацији (114).

Активност CAT и SOD била је већа код здравих испитаника у поређењу са пацијентима (Графици 47 и 49). Исти тренд је забележен у студији *Feijóo* и сарадника (107). Већа активност супероксид дисмутазе и каталазе праћена сниженим концентрацијама прооксидационих параметара код здравих контрола у поређењу са пацијентима са РА примећена је и у раније спроведеним студијама (118, 220, 223).

Претрагом литературе пронађен је велики број студија које су показале повишене вредности GSH биле у контролној групи у односу на пацијенте са РА (107, 118, 220, 223). У нашем истраживању, вредности GSH се нису статистички значајно разликовале између група што је у корелацији са резултатима студије *Cimen* и сарадници, код којих је примећен исти тренд (228). Оксидациони стрес удружен са инфламацијом у зглобу, може узроковати разарање везивног ткива које доводи до периартикуларних деформитета у РА.

5.6. Утицај менопаузе на оксидациони стрес

Оксидациони стрес настаје или током повећаног стварања оксиданаса или смањене елиминације од стране антиоксидационог система заштите. Међутим, остаје непознаница како менопауза код здравих жена и жена са реуматодним артритисом утиче на оксидациони статус.

Као што је раније поменуто, менопауза као форма репродуктивног старења је стање које се дефинише као губитак фоликуларне активности јајника са изостанком менструалног циклуса, која физиолошки настаје између 45-55 године (229) или може бити последица хируршких интервенција, хемиотерапије или других обољења (230). Током менопаузе, долази до смањења и престанка секреције естрогена и прогестерона (231) који имају велики значај у развоју различитих патолошких стања. Оксидациони стрес игра важну улогу у процесу старења који за последицу има повећану концентрацију слободних радикала, као што су реактивне кисеоничне врсте које су присутне у значајно већој концентрацији у односу на антиоксидационе механизме заштите (232).

У нашем истраживању примећена је знатно већа концентрација индекса липидне пероксидације код жена у менопаузи у односу на пременопаузалну групу и у популацији здравих испитаника као и код оболелих од РА. Такође, вредности водоник-пероксида биле су значајно више у постменопаузалној популацији пацијената са РА. Могући разлог оваквих резултата јесте управо смањење концентрације естрогена код

жена у менопаузи, односно сама структура овог хормона. При високим концентрацијама, естроген има тенденцију да инхибира 8-хидроксилацију гуанинских ДНК база, при чему остварује антиоксидациони ефекат. Међутим, при ниским концентрацијама, у стањима као што је менопауза, посебно када у својој хемијској структури садржи катехол, овај хормон има прооксидациони ефекат, који доводи и до оксидације база (233).

Индекс липидне пероксидације показао је значајан пораст у групи жена које су у менопаузи у односу на здраве жене пре менопаузе. Претходна истраживања указују на повећање вредности укупног оксидационог стреса код жена у менопаузи са дијагностикованом остеопорозом, као и смањење укупног антиоксидационог статуса у односу на здраву популацију (234). Наши резултати су у корелацији са претходним истраживањима у којима је присутно значајно повећање параметра оксидационог стреса, малоналдехида, у здравој популацији жена у менопаузи у поређењу са женама пре менопаузе (235, 236), као и непромењене вредности супероксид-дисмутазе (235). У менопаузи су такође примећене смањене вредности глутатион пероксидазе (236).

Резултати нашег истраживања показали су значајно смањење концентрације нитрита код жена оболелих од РА у пременопаузи у односу на контролну групу жена у пременопаузи, као и смањење вредности овог параметра код жена оболелих од РА у односу на популацију здравих жена исте доби. Претходна истраживања указују да постменопаузалне жене имају мању концентрацију азот-моноксида у односу на жене које нису у менопаузи (237). Такође, већи ниво азот-моноксида је примећен код пременопаузалних жена и као такав има кардиопротективни ефекат као и инхибиторни ефекат на пропацију глатких мишића, који је карактеристична за болести срца (217).

Претходно наведено указује на веома битну улогу естрогена и других хормона у менопаузи као и повећање ризика за настанак кардиоваскуларних болести у овој животној доби. Управо због тога, развијен је велики број лекова који се користи у терапији дефицита естрогена и неповољног редокс статуса који су показали позитиван ефекат за ове индикације. Особе које не могу да толеришу наведене лекове или њихове нежељене ефекте, физичка активност и суплементација антиоксидансима такође се могу користити за сузбијање симптома менопаузе, спречавање настанка оксидационог стреса и смањење ризика за настанак кардиоваскуларних болести (237, 250).

5.7. Утицај реуматоидног артритиса на неспецифичне маркере инфламације

Између испитиваних група није постојала разлика у погледу присуства традиционалних и осталих фактора ризика за настанак кардиоваскуларних болести као што су пушење, хипертензија, дијабетес, индекс телесне масе, хиперлипидемија и присуство претходних кардиоваскуларних догађаја.

Међутим, у прилог постојања инфламације, пацијенти са РА имали су веће вредности неспецифичних маркера запаљења, као што су Ц-реактивни протеин, седиментација и фибриноген, што је у сагласности са претходним истраживањем (196). Чак и код пацијената код којих се сматра да је болест контролисана, показано је да је повећање концентрације Ц-реактивног протеина пропорционално повезано са високим или веома високим ризиком за будуће кардиоваскуларне догађаје (238). Говорећи у прилог инфламацији у РА, активност фосфолипазе А₂ је значајно повишена у синовијалној течности и серуму пацијената са РА. Предоминантно фосфолипазе А₂ настаје од активираних тромбоцита и катализује синтезу арахидонске киселине која се конвертује до простагландина деловањем циклооксигеназе 2, есенцијалних за развој инфламације (74). МП које потичу од тромбоцита а које су у нашем истраживању присутне у већој концентрацији код пацијената са РА у односу на здраве контроле, учествују у транспорту арахидонске киселине и доводе до повећане експресије циклооксигеназе 2 (239). Пероксидацијом арахидонске настаје малондиалдехид, посебно токсичан алдехид који доводи до настанка оксидационог стреса (109). Резултати наше студије показали су повећање вредности индекса липидне пероксидације код пацијената са РА, што може бити последица инфламације. Такође, корелација између активности болести, која се одређује на основу неспецифичних параметара инфламације, и глобалних параметара хемостазе, забележена је у нашој студији. Овакав резултат додатно иде у прилог чињеници да запаљење које је у основи РА има велики утицај на хемостазу.

5.8. Утицај менопаузе на минералну густину костију

Остеопороза се као системска болест скелетног система карактерише смањеном густином и поремећајем настанка коштаног ткива. У основи болести је неравнотежа између ресорпције и формирања костију што последично доводи до повећања ризика за настанак прелома. Фактори ризика за настанак остеопорозе су женски пол, године старости, ендокрини и нутритивни поремећаји, лекови као што су кортикостероиди, системске инфламаторне болести (240). Поред наведеног, велики утицај на настанак остеопорозе и прелома има менопауза.

Са повећањем Т-скора између -1 и $-2,5$, расте ризик за настанак прелома за 17,6%. Уколико је вредност Т-скора нижа од $-2,5$, ризик се повећава и износи 46,3%. Међутим, највећи број прелома се дешава у остеопенији (241). Код пацијената са РА, остеопороза представља ван-зглобну манифестацију болести. Наши резултати указују на значајно већи проценат жена са поремећајем густине костију у групи пацијенткиња са РА. Нормалан налаз у контролној групи имало је 52,1% жена, док је у експерименталној тај број био значајно нижи и износи је свега 16,7%. Остеопенију је имало значајно више жена са дијагностикованим РА, 69%, у поређењу са 37,5% код здравих контрола. Процент жена оболелих од остеопорозе био је приближно исти и износио је 10,4% у контролној и 14,3% у експерименталној групи. Овакав резултат иде у прилог претходно поменутој чињеници да женски пол, године старости и терапија глукокортикоидима имају велики утицај на поремећај минералне густине костију.

Иако је лечење РА усмерено ка проинфламаторним цитокинима, ови лекови могу директно или индиректно успорити прогресију болести али не могу утицати на остеопорозу (242). Конвенционални антиреуматски лекови који модификују болест, као што су метотрексат и сулфасалазин, показали су лимитиране резултате, с обзиром да је опоравак ерозије костију био 7–10% (243). Ерозија костију се јавља на почетку болести, понекад у првих неколико недеља након постављања дијагнозе и предиктор је лоше прогнозе. Више од 10% пацијената развије ерозију костију у периоду од 8 недеља од почетка болести, док 60% има ерозију након годину дана (244). Све ово последично доводи до губљења функционалне способности, погоршања квалитета живота, инвалидитета, пораста морбидитета и морталитета. Према истраживању које су спровели *Arain* и сарадници, укупно 25% пацијената у раној фази болести имало је поремећај минералне густине костију. Старост, серопозитивност и менопауза су фактори који највише доприносе оваквом резултату (245).

Реуматоидни артритис се између осталог, карактерише и системским губитком коштане масе, и то 56% код постменопаузалних жена и 18% код пременопаузалних жена (246). Ово је готово скоро два пута већа преваленца у поређењу са популацијом жена исте животне доби, која није у менопаузи (247). Посматрано у односу на менопаузу, у нашем истраживању највећи проценат нормалног налаза био је у популацији здравих жена пре менопаузе (71,4%), док је најнижи код пацијенткиња са РА у менопаузи (9,7%). Најмањи број постављених дијагноза остеопеније био је код здравих жена пре менопаузе (28,6%), док је највиши проценат био у популацији жена са РА у менопаузи (71%). Када је у питању остеопороза, ниједан случај није забележен код пременопаузалних жена у обе испитиване групе, док је код жена у менопаузи, број оболелих био сличан, 14,7% у контролној и 19,3% у експерименталној групи, што је у сагласности са претходним истраживањем (245). Код жена у постменопаузи хомеостаза костију је нарушена старењем и дефицијенцијом хормона. Развој постменопаузалне остеопорозе је повезан са недостатком естрогена. Смањење концентрације естрогена, доводи до дисрегулације имуног система, која се манифестује асиметричном дистрибуцијом Т-помоћничких ћелија (Th17). То доводи до померања и нарушавања равнотеже, према повишеним нивоима антиинфламаторних цитокина, посебно TNF α , IL-17 и RANKL и до убрзаног губитка коштане масе (247). TNF α , IL-17 стимулишу ресорпцију и инхибирају формирање костију. Инфламаторни цитокини као што су TNF и IL-6, у инфламраном синовијуму индукују диференцијацију остеокласта и супримирају диференцијацију остеобласта, доводећи до неравнотеже у метаболизму костију (242). Такође, на производњу цитокина утиче и менопауза. Серумски нивои проинфламаторних цитокина IL-1, IL-6 и TNF α се повећавају након природне менопаузе или менопаузе настале након хируршке интервенције, и смањују након естрогенске терапије (249).

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

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

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

тромбоцита могу бити потенцијални биомаркер за тромбоцитну реактивност у РА, која представља предиктор за настанак тромбозе и субклиничке атеросклерозе и последично повећава кардиоваскуларни ризик.

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

VII

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Goldblatt F, O'Neill SG. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. *Lancet* 2013; 382(9894): 797-808.
2. Moroni L, Bianchi I, Lleo A. Geoepidemiology, gender and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7): A386-92.
3. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ, Montoya-Ortiz G, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun* 2012; 38(2-3): J109-19.
4. Oliver JE, Silman AJ. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 2009; 11(5): 252.
5. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016; 388(10055): 2023-38.
6. Dye JR, Ullal AJ, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2013; 78(2): 140-8.
7. Angelotti F, Parma A, Cafaro G, Capecchi R, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2017; 35(3): 368-78.
8. Talsania M, Scofield RH. Menopause and Rheumatic Disease. *Rheum Dis Clin North Am* 2017; 43(2): 287-302.
9. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(7): 1316-22.
10. Ungurianu A, Margină D, Grădinaru D, Băcanu C, Ilie M, Tsitsimpikou C, et al. Lipoprotein redox status evaluation as a marker of cardiovascular disease risk in patients with inflammatory disease. *Mol Med Rep* 2017; 15(1): 256-62.
11. Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, et al; QUEST-RA Group. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(1): R7.
12. Rojas-Villarraga A, Toro CE, Espinosa G, Rodríguez-Velosa Y, Duarte-Rey C, Mantilla RD, et al. Factors influencing polyautoimmunity in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2010; 9(4): 229-32.

13. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 18001.
14. Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A. Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2011; 78(2): 179-83.
15. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2010; 9(5): A288-92.
16. van den Oever IA, Sattar N, Nurmohamed MT. Thromboembolic and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: role of the haemostatic system. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(6): 954-7.
17. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36(3): 182-8.
18. Del Puente A, Knowler WC, Pettitt DJ, Bennett PH. High incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Pima Indians. *Am J Epidemiol* 1989; 129(6): 1170-8.
19. Harvey J, Lotze M, Stevens MB, Lambert G, Jacobson D. Rheumatoid arthritis in a Chippewa Band. I. Pilot screening study of disease prevalence. *Arthritis Rheum* 1981; 24(5): 717-21.
20. Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(10): 1427-30.
21. Adomaviciute D, Pileckyte M, Baranauskaite A, Morvan J, Dadoniene J, Guillemin F. Prevalence survey of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis in Lithuania. *Scand J Rheumatol* 2008; 37(2): 113-9.
22. Tuncer T, Gilgil E, Kaçar C, Kurtaiş Y, Kutlay Ş, Bütün B, et al. Prevalence of Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis in Turkey: A Nationwide Study. *Arch Rheumatol* 2017; 33(2): 128-36.
23. Zlatković-Švenda MI, Stojanović RM, B Šipetić-Grujičić S, Guillemin F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia. *Rheumatol Int* 2014; 34(5): 649-58.
24. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995; 1(12): 1279-83.
25. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Serioli B, Secchi ME, Villaggio B, et al. Estrogens and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089: 538-47.

26. Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmun Rev* 2008; 7(8): 626-30.
27. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M, et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30(12): 2597-605.
28. Cutolo M, Seriola B, Villaggio B, Pizzorni C, Craviotto C, Sulli A. Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 131-42.
29. Kaliterna DM, Perković D, Radić M, Krstulović DM, Borić K, Marinović I. Sex hormones, immune disorders, and inflammatory rheumatic diseases. *Reumatizam* 2014; 61(1): 17-22.
30. Cutolo M, Sulli A, Capellino S, Villaggio B, Montagna P, Pizzorni C, et al. Anti-TNF and sex hormones. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069: 391-400.
31. Spector TD, Perry LA, Tubb G, Silman AJ, Huskisson EC. Low free testosterone levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1988; 47(1): 65-8.
32. Bellucci E, Terenzi R, La Paglia GM, Gentileschi S, Tripoli A, Tani C, et al. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2016; 34(5): 793-801.
33. Haus E, Sackett-Lundeen L, Smolensky MH. Rheumatoid arthritis: circadian rhythms in disease activity, signs and symptoms, and rationale for chronotherapy with corticosteroids and other medications. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2012; 70 Suppl1: 3-10.
34. Zoli A, Lizzio MM, Ferlisi EM, Massafra V, Mirone L, Barini A, et al. ACTH, cortisol and prolactin in active rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2002; 21(4): 289-93.
35. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32(10): 903-7.
36. Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Turesson C. Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 378–81.
37. Pikwer M, Nilsson JÅ, Bergström U, Jacobsson LT, Turesson C. Early menopause and severity of rheumatoid arthritis in women older than 45 years. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(4): R190.
38. Bengtsson C, Malspeis S, Orellana C, Sparks JA, Costenbader KH, Karlson EW. Association Between Menopausal Factors and the Risk of Seronegative and

- Seropositive Rheumatoid Arthritis: Results From the Nurses' Health Studies. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2017; 69(11): 1676–84.
39. Goemaere S, Ackerman C, Goethals K, De Keyser F, Van der Straeten C, Verbruggen G, et al. Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. *J Rheumatol* 1990; 17(12): 1620-2.
 40. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2017; 389(10086): 2338-48.
 41. Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(9): 1524-9.
 42. Lauper K, Gabay C. Cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 2017; 39(4): 447-59.
 43. Baghdadi LR, Woodman RJ, Shanahan EM, Mangoni AA. The impact of traditional cardiovascular risk factors on cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10(2): e0117952.
 44. Chung WS, Peng CL, Lin CL, Chang YJ, Chen YF, Chiang JY, et al. Rheumatoid arthritis increases the risk of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(10): 1774-80.
 45. Ramagopalan SV, Wotton CJ, Handel AE, Yeates D, Goldacre MJ. Risk of venous thromboembolism in people admitted to hospital with selected immune-mediated diseases: record-linkage study. *BMC Med* 2011; 9: 1.
 46. Solomon DH, Bitton A, Katz JN, Radner H, Brown EM, Fraenkel L. Review: treat to target in rheumatoid arthritis: fact, fiction, or hypothesis? *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(4): 775-82.
 47. van Nies JA, Krabben A, Schoones JW, Huizinga TW, Kloppenburg M, van der Helm-van Mil AH. What is the evidence for the presence of a therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis? A systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2014; 73: 861–70.
 48. van Nies JA, Tsonaka R, Gaujoux-Viala C, Fautrel B, van der Helm-van Mil AH. Evaluating relationships between symptom duration and persistence of rheumatoid arthritis: does a window of opportunity exist? Results on the Leiden early arthritis clinic and ESPOIR cohorts. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 806–12.

49. Burmester GR, Bijlsma J, Cutolo M, McInnes IB. Managing rheumatic and musculoskeletal diseases - past, present and future. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(7): 443-8.
50. Westlake SL, Colebatch AN, Baird J, Kiely P, Quinn M, Choy E, et al. The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49(2): 295-307.
51. Ruysse-Witrand A, Fautrel B, Saraux A, Le Loët X, Pham T. Cardiovascular risk induced by low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Joint Bone Spine* 2011; 78(1): 23-30.
52. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis* 2017; 76(6): 960-77.
53. Barbhuiya M, Solomon DH. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: an update on treatment issues. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25(3): 317-24.
54. Kisiel B, Kruszewski R, Juszkiewicz A, Raczkiwicz A, Bachtta A, Thustochowicz M, et al. Methotrexate, Cyclosporine A, and Biologics Protect against Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2015; 2015: 759610.
55. Carbone F, Bonaventura A, Liberale L, Paolino S, Torre F, Dallegri F, et al. Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis: Promoters and Opponents. *Clin Rev Allergy Immunol* 2018. doi: 10.1007/s12016-018-8714-z.
56. Ingegnoli F, Fantini F, Griffini S, Soldi A, Meroni P, Cugno M. Anti-tumor necrosis factor alpha therapy normalises fibrinolysis impairment in patients with active rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 254-7.
57. Agirbasli M, Inanc N, Baykan Oa, Direskeneli H. The effects of TNF alpha inhibition on plasma fibrinolytic balance in patients with chronic inflammatory rheumatic disorders. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 580-3.
58. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013; 200: 373-83.
59. Sellam J, Proulle V, Jünger A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg JE, et al. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(5): R156.

60. Cunningham M, Marks N, Barnado A, Wirth JR, Gilkeson G, Markiewicz M. Are microparticles the missing link between thrombosis and autoimmune diseases? Involvement in selected rheumatologic diseases. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40(6): 675-81.
61. Rodríguez-Carrio J, Alperi-López M, López P, Alonso-Castro S, Carro-Esteban SR, Ballina-García FJ, et al. Altered profile of circulating microparticles in rheumatoid arthritis patients. *Clin Sci (Lond)* 2015; 128(7): 437-48.
62. Pisetsky DS, Ullal AJ, Gauley J, Ning TC. Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(10): 1737-46.
63. Olumuyiwa-Akeredolu OO, Pretorius E. Platelet and red blood cell interactions and their role in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2015; 35(12): 1955-64.
64. Teruel R, Corral J, Perez-Andreu V, Martinez-Martinez I, Vicente V, Martinez C. Potential role of miRNAs in developmental haemostasis. *PLoS One* 2011; 6: e17648.
65. Šibíková M, Živný J, Janota J. Cell Membrane-Derived Microvesicles in Systemic Inflammatory Response. *Folia Biol (Praha)* 2018; 64(4): 113-24.
66. Barbatí C, Vomero M, Colasanti T, Ceccarelli F, Marcosano M, Miranda F, et al. Microparticles and autophagy: a new frontier in the understanding of atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Immunol Res* 2018; 66(6): 655-62.
67. Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol* 2004; 11(3):156-64.
68. Yong PJ, Koh CH, Shim WS. Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction? *Eur J Prev Cardiol* 2013; 20(3): 496-512.
69. Schroit AJ, Tanaka Y, Madsen J, Fidler IJ. The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* 1984; 51: 227-38.
70. Erdbrugger U, Le TH. Extracellular vesicles in renal diseases: more than novel biomarkers? *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 12-26.
71. Mobarrez F, Abraham-Nordling M, Aguilera-Gatica K, Friberg I, Antovic A, Pisetsky DS, et al. The expression of microvesicles in the blood of patients with Graves' disease and its relationship to treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016; 84(5): 729-35.
72. Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1512-8.

73. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107: 1047–57.
74. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 1498–503.
75. Melki I, Tessandier N, Zufferey A, Boilard E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets* 2017; 28(3): 214–21.
76. Nozaki T, Sugiyama S, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, Konishi M, et al. Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010; 12(11): 1223-8.
77. Fan W, Wang W, Wu J, Ma L, Guo J. Identification of CD4(+) T-cell-derived CD161(+) CD39(+) and CD39(+)CD73(+) microparticles as new biomarkers for rheumatoid arthritis. *Biomark Med* 2017; 11(2): 107-16.
78. Harifi G, Sabilia J. Pathogenic role of platelets in rheumatoid arthritis and systemic autoimmune diseases. Perspectives and therapeutic aspects. *Saudi Med J* 2016; 37(4): 354-60.
79. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 2010; 327(5965): 580-3.
80. Michou L, Cornélis F, Baron M, Bombardieri S, Balsa A, Westhovens R, et al. Association study of the platelet collagen receptor glycoprotein VI gene with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31(5): 770-2.
81. Ollikainen E, Mikkelsen J, Perola M, Penttilä A, Karhunen PJ. Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2004; 176(1): 95-9.
82. Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem* 1991; 266(32): 21833-8.
83. Hsu J, Gu Y, Tan SL, Narula S, DeMartino JA, Liao C. Bruton's Tyrosine Kinase mediates platelet receptor-induced generation of microparticles: a potential mechanism for amplification of inflammatory responses in rheumatoid arthritis synovial joints. *Immunol Lett* 2013; 150(1-2): 97-104.

84. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(5): H1910-5.
85. Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 2003, 38(5): 1075-89. Erratum in: *J Vasc Surg*. 2004; 39(1):188.
86. Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S: Effects of eicosapentaenoic acid on platelet activation markers and cell adhesion molecules in hyperlipidemic patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003, 17: 153–9.
87. Myers D Jr, Farris D, Hawley A, Wroblewski S, Chapman A, Stoolman L, et al. Selectins influence thrombosis in a mouse model of experimental deep venous thrombosis. *J Surg Res* 2002; 108(2): 212-21.
88. Connor DE, Exner T, Ma DD, Joseph JE. Detection of the procoagulant activity of microparticle-associated phosphatidylserine using XACT. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20: 558–64.
89. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1:136-9.
90. Lacroix R, Sabatier F, Mialhe A, Basire A, Pannell R, Borghi H, et al. Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2007; 110: 2432–9.
91. Seré KM, Hackeng TM. Basic mechanisms of hemostasis. *Semin Vasc Med* 2003; 3(1): 3-12.
92. Egorina EM, Sovershaev MA, Hansen JB. The role of tissue factor in systemic inflammatory response syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2011; 22(6): 451-6.
93. Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation* 2004 ;109(22): 2698-704.
94. Salvagno GL, Berntorp E. Thrombin Generation Assays (TGAs). *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 515-22.
95. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8): 1894-904.
96. Hoppe B. Fibrinogen and factor XIII at the intersection of coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Thromb Haemost* 2014; 112(4): 649-58.

97. Flick MJ, LaJeunesse CM, Talmage KE, Witte DP, Palumbo JS, Pinkerton MD, et al. Fibrin(ogen) exacerbates inflammatory joint disease through a mechanism linked to the integrin alphaMbeta2 binding motif. *J Clin Invest* 2007; 117(11): 3224-35.
98. Dahlbäck B, Villoutreix BO. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(7): 1311-20.
99. Miljić P, Heylen E, Willemse J, Djordjević V, Radojković D, Colović M, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Srp Arh Celok Lek* 2010; 138 Suppl 1: 74-8.
100. Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 386-91.
101. Song JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, Wang TH, et al. Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 2011; 121(9): 3517-27.
102. Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JC, Bouma BN. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood* 2003; 101(12): 4844-6.
103. Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF. Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. *J Clin Invest* 1995; 96(5): 2534-8.
104. Orbe J, Alexandru N, Roncal C, Belzunce M, Bibiot P, Rodriguez JA, et al. Lack of TAFI increases brain damage and microparticle generation after thrombolytic therapy in ischemic stroke. *Thromb Res* 2015; 136(2): 445-50.
105. Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Autoimmune diseases and venous thromboembolism: a review of the literature. *Am J Cardiovasc Dis* 2012; 2(3): 171-83.
106. Sack MN, Fyhrquist FY, Saijonmaa OJ, Fuster V, Kovacic JC. Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70(2): 196-211.
107. Feijóo M, Túnez I, Ruiz A, Tasset I, Muñoz E, Collantes E. Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage. *Reumatol Clin* 2010; 6(2): 91-4.
108. Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry* 2008; 27(4): 409-25.

109. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141(2): 312-22.
110. Cohen G. Enzymatic/nonenzymatic sources of oxyradicals and regulation of antioxidant defenses. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 8-14.
111. Colak E. New markers of oxidative damage to macromolecules. *Journal of Medical Biochemistry* 2008; 27(1): 1–16.
112. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, Hamza AB. Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2016; 97: 285-91.
113. Vaya J. Exogenous markers for the characterization of human diseases associated with oxidative stress. *Biochimie* 2013; 95(3): 578-84.
114. Mateen S, Moin S, Zafar A, Khan AQ. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clin Chim Acta* 2016; 463: 4-10.
115. Bates EJ, Lowther DA, Handley CJ. Oxygen free-radicals mediate an inhibition of proteoglycan synthesis in cultured articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1984; 43(3): 462-9.
116. Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free Radic Res* 2012; 46(12): 1482-9.
117. Tiku ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 2000; 275: 20069–76.
118. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2016; 11(4): e0152925.
119. Kalpakcioglu B, Senel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27(2): 141-5.
120. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(9): 1580-8.

121. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(2): 244-57.
122. Gossec L, Paternotte S, Aanerud GJ, Balanescu A, Boumpas DT, Carmona L, et al. Finalisation and validation of the rheumatoid arthritis impact of disease score, a patient-derived composite measure of impact of rheumatoid arthritis: a EULAR initiative. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(6): 935-42
123. Maksimovic M, Lazarevic M, Erdeljan B, Savic A. Uticaj jutarnje ukocenosti, vrednosti DAS 28 i DAS28CRP, vas aktivnosti bolesti na vrednosti HAQ-DI skora kod pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa lecenih bioloskom terapijom MD-Medical Data 2014; 6(3): 237-42.
124. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheum Dis Clin North Am* 2009; 35(4): 745-57, vii-viii.
125. Bruce B, Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress, and documentation. *J Rheumatol* 2003; 30(1): 167-78.
126. Antovic JP, Mikovic D, Elezovic I, Holmström M, Wilkens M, Elfvinge P, et al. Two global haemostatic assays as additional tools to monitor treatment in cases of haemophilia A. *Thromb Haemost* 2012; 108(1): 21-31.
127. Antovic A. The overall hemostasis potential: a laboratory tool for the investigation of global hemostasis. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36(7): 772-9.
128. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ; clot, EuroCLOT Investigators. Heritability of formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(12): 2783-9.
129. Antovic A, Mikovic D, Elezovic I, Zabczyk M, Huttenby K, Antovic JP. Improvement of fibrin clot structure after factor VIII injection in haemophilia A patients treated on demand. *Thromb Haemost* 2014; 111(4): 656-61.
130. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
131. Pick E, Keisari Y. A simple colometric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38: 161-70.
132. Auclair C, Voisin E. Nitrobluetetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRP Press, Boca Raton 1985: pp 123-32.

133. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131–8.
134. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; 244: 6056–63.
135. Beutler E. Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York 1982: pp 105–6.
136. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxidedismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170–5.
137. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E, ed. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Philadelphia: Grune and Stratton; 1984: 83-85.
138. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York 1975: pp 112–4.
139. Lacroix R, Dubois C, Leroyer AS, Sabatier F, Dignat-George F. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013; 11 Suppl 1: 24-35.
140. Zhang Y, Zhao C, Wei Y, Yang S, Cui C, Yang J, et al. Increased circulating microparticles in women with preeclampsia. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 352-8.
141. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004; 125: 804–13.
142. Thaler J, Ay C, Mackman N, Bertina RM, Kaider A, Marosi C, et al. Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost* 2012; 10(7): 1363-70.
143. Bachelier K, Biehl S, Schwarz V, Kindermann I, Kandolf R, Sauter M, et al. Parvovirus B19-induced vascular damage in the heart is associated with elevated circulating endothelial microparticles. *PLoS One* 2017; 12(5): e0176311.
144. Curry N, Raja A, Beavis J, Stanworth S, Harrison P. Levels of procoagulant microvesicles are elevated after traumatic injury and platelet microvesicles are negatively correlated with mortality. *J Extracell Vesicles* 2014; 3: 25625.
145. O'Dea KP, Porter JR, Tirlapur N, Katbeh U, Singh S, Handy JM, et al. Circulating Microvesicles Are Elevated Acutely following Major Burns Injury and Associated with Clinical Severity. *PLoS One* 2016; 11(12): e0167801.

146. van Eijk IC, Tushuizen ME, Sturk A, Dijkmans BA, Boers M, Voskuyl AE, et al. Circulating microparticles remain associated with complement activation despite intensive anti-inflammatory therapy in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(7): 1378-82.
147. Iversen LV, Østergaard O, Ullman S, Nielsen CT, Halberg P, Karlsmark T, et al. Circulating microparticles and plasma levels of soluble E- and P-selectins in patients with systemic sclerosis. *Scand J Rheumatol* 2013; 42(6): 473-82.
148. Guiducci S, Distler JH, Jungel A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2845–53.
149. Chamouard P, Desprez D, Hugel B, Kunzelmann C, Gidon-Jeangirard C, Lessard M, et al. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 574–80.
150. Sáenz-Cuesta M, Irizar H, Castillo-Triviño T, Muñoz-Culla M, Osorio-Querejeta I, Prada A, et al. Circulating microparticles reflect treatment effects and clinical status in multiple sclerosis. *Biomark Med* 2014; 8(5): 653-61.
151. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. *Thromb Haemost* 2006; 95(1): 94–9.
152. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104: 93–102.
153. Niccolai E, Squatrito D, Emmi G, Silvestri E, Emmi L, Ciucciarelli L, et al. A new cytofluorimetric approach to evaluate the circulating microparticles in subjects with antiphospholipid antibodies. *Thromb Res* 2015; 136(6): 1252-8.
154. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, Wyss K, Kirsch T, Woywodt A, et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1820–5.
155. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int* 2006; 69: 1416–23.

156. Shirafuji T, Hamaguchi H, Higuchi M, Kanda F. Measurement of platelet-derived microparticle levels using an enzyme-linked immunosorbent assay in polymyositis and dermatomyositis patients. *Muscle nerve* 2009; 39: 586–90.
157. Vikerfors A, Mobarrez F, Bremme K, Holmström M, Ågren A, Eelde A, et al. Studies of microparticles in patients with the antiphospholipid syndrome (APS). *Lupus* 2012; 21(7): 802-5.
158. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(1): 21-9.
159. Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev* 2014; 28(4): 155-66.
160. Shi J, Heegaard CW, Rasmussen JT, Gilbert GE. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1667(1): 82-90.
161. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 2009; 101: 439–51.
162. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 2004; 53(4): 210-30.
163. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2011; 105 Suppl 1: S13-33.
164. Xue LJ, Cui BB, Li X, Huang QR, Liu Y, Lin H. Association of Elevated Platelet Microparticles with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2017; 48(3): 405-9.
165. Michael BNR, Kommoju V, Kavadichanda Ganapathy C, Negi VS. Characterization of cell-derived microparticles in synovial fluid and plasma of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2019; 39(8): 1377-87.
166. Jy W, Mao WW, Horstman LL, Tao J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21: 217–31.
167. Nomura S, Okamae F, Abe M, Hosokawa M, Yamaoka M, Ohtani T, et al. Platelets expressing P-selectin and platelet-derived microparticles in stored platelet concentrates bind to PSGL-1 on filtrated leukocytes. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000; 6(4): 213-21.
168. Ertenli I, Kiraz S, Arici M, Haznedaroglu IC, Calgüneri M, Celik I, et al. P-selectin as a circulating molecular marker in rheumatoid arthritis with thrombocytosis. *J Rheumatol* 1998; 25(6): 1054-8.

169. Pamuk GE, Vural O, Turgut B, Demir M, Pamuk ON, Cakir N. Increased platelet activation markers in rheumatoid arthritis: are they related with subclinical atherosclerosis? *Platelets* 2008; 19(2): 146-54.
170. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998; 102: 136–44.
171. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999; 94(11): 3791-9.
172. Heloïre F, Weill B, Weber S, Batteux F. Aggregates of endothelial microparticles and platelets circulate in peripheral blood. Variations during stable coronary disease and acute myocardial infarction. *Thromb Res* 2003; 110: 173–80.
173. Distler JH, Jüngel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF 3rd, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(8): 2892-7.
174. Hjeltnes G, Hollan I, Førre O, Wiik A, Lyberg T, Mikkelsen K, et al. Serum levels of lipoprotein(a) and E-selectin are reduced in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate or methotrexate in combination with TNF- α -inhibitor. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31(3): 415-21.
175. Kuuliala A, Eberhardt K, Takala A, Kautiainen H, Repo H, Leirisalo-Repo M. Circulating soluble E-selectin in early rheumatoid arthritis: a prospective five year study. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 242-6.
176. Yu G, Rux Ah, Ma P, Bdeir K, Sachais Bs. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. *Blood* 2005; 105: 3545-51.
177. Klimek E, Skalska A, Kwaśny-Krochin B, Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, et al. Differential associations of inflammatory and endothelial biomarkers with disease activity in rheumatoid arthritis of short duration. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 681635.
178. Poncelet P, Robert S, Bailly N, Garnache-Ottou F, Bouriche T, Devalet B, et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. *Transfus Apher Sci* 2015; 53(2): 110-26.

179. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(8): 1687–93.
180. Osterud B, Breimo ES, Olsen JO. Blood borne tissue factor revisited. *Thromb Res* 2008; 122(3): 432-4.
181. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134(5): 1087-97.
182. Widdifield J, Abrahamowicz M, Paterson JM, Huang A, Thorne JC, Pope JE, et al. Associations Between Methotrexate Use and the Risk of Cardiovascular Events in Patients with Elderly-onset Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 2019; 46(5): 467-74.
183. Davis JM 3rd, Maradit-Kremers H, Gabriel SE. Use of low-dose glucocorticoids and the risk of cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis: what is the true direction of effect? *J Rheumatol* 2005; 32(10):1856-62.
184. Pelletier F, Garnache-Ottou F, Biichlé S, Vivot A, Humbert P, Saas P, et al. Effects of anti-TNF- α agents on circulating endothelial-derived and platelet-derived microparticles in psoriasis. *Exp Dermatol* 2014; 23(12): 924-5.
185. Ichijo M, Ishibashi S, Ohkubo T, Nomura S, Sanjo N, Yokota T, et al. Elevated platelet microparticle levels after acute ischemic stroke with concurrent idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2014; 23(3): 587-9.
186. Kang PD, Shen B, Yang J, Dang HS, Pei FX. Platelet and endothelial cell-derived microparticles in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head of rabbit model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007 ;87(29):2045-9.
187. He S, Bremme K, Blombäck M. A laboratory method for determination of overall haemostatic potential in plasma. I. Method design and preliminary results. *Thromb Res* 1999; 96(2): 145-56.
188. Antovic JP, Yngen M, Ostenson CG, Antovic A, Wallen HN, Jorneskög G, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and hemostatic changes in patients with type I diabetes mellitus with and without microvascular complications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14(6): 551–6.
189. Anzej S, Bozic M, Antovic A, Peternel P, Gaspersic N, Rot U, et al. Evidence of hypercoagulability and inflammation in young patients long after acute cerebral ischaemia. *Thromb Res* 2007; 120(1): 39–46.
190. Rooth E, Wallen H, Antovic A, von Arbin M, Kaponides G, Wahlgren N, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and its relationship to fibrinolysis and

- inflammation during the acute and convalescent phase of ischemic stroke. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18(4): 365–70.
191. Borjas-Howard JF, Leeuw K, Rutgers A, Meijer K, Tichelaar VYIG. Risk of Recurrent Venous Thromboembolism in Autoimmune Diseases: A Systematic Review of the Literature. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(2): 141-9.
192. Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden. *Lancet* 2012; 379(9812): 244-9.
193. Yang X, Chang Y, Wei W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm* 2016; 2016: 6813016.
194. Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des* 2012; 18(11):1478-93.
195. Undas A, Gissel M, Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Mann Kg, Brummel-Ziedins Ke. Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb Haemost* 2010; 104: 224–30.
196. Kern A, Balog A, Dulic S, Barabás E, Kiszalák M, Vásárhelyi B. Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. *J Thromb Thrombolysis* 2016; 41(3): 359-64.
197. Lanir N, Ciano PS, van de Water L, Mcdonagh J, Dvorak Am, Dvorak Hf et al. Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *J. Immunol* 1988; 140: 2340-9.
198. Renda G, Patti G, Lang IM, Siller-Matula JM, Hylek EM, Ambrosio G; Working Group on Thrombosis of the Italian Society of Cardiology. Thrombotic and hemorrhagic burden in women: Gender-related issues in the response to antithrombotic therapies. *Int J Cardiol* 2019; 286: 198-207.
199. Newson L: Menopause and cardiovascular disease. *Post Reprod Health* 2018; 24(1): 44-9.
200. Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics (Sao Paulo)* 2007; 62(1): 77-86.
201. Piróg M, Jach R, Kacalska-Janssen O. Differential effect of the ultra-low dose and standard estrogen plus dydrogesterone therapy on thrombin generation and fibrinolysis in postmenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2017; 96(12): 1438-45.

202. Kuiper S, van Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, da Silva JA, van Riel PL. Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(8): 1809-16.
203. Mollard E, Pedro S, Chakravarty E, Clowse M, Schumacher R, Michaud K. The impact of menopause on functional status in women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2018; 57(5): 798-802.
204. Dhillon PK, Adams MJ. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: role of impaired fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(4): 434-40.
205. Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Undas A. Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis. *Thromb Res* 2010; 126(1): e11-6.
206. Lord ST. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(3): 494-9.
207. Martínez-Zamora MA, Tassies D, Carmona F, Espinosa G, Cervera R, Reverter JC, et al. Clot lysis time and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in severe preeclampsia with or without associated antiphospholipid antibodies. *J Reprod Immunol* 2010; 86(2): 133-40.
208. Pretorius E, Oberholzer HM, van der Spuy WJ, Swanepoel AC, Soma P. Scanning electron microscopy of fibrin networks in rheumatoid arthritis: a qualitative analysis. *Rheumatol Int* 2012; 32(6): 1611-5.
209. Siudut J, Świat M, Undas A. Altered Fibrin Clot Properties in Patients With Cerebral Venous Sinus Thrombosis: Association With the Risk of Recurrence. *Stroke* 2015; 46(9): 2665-8.
210. Tehrani S, Jörneskog G, Ågren A, Lins PE, Wallén H, Antovic A. Fibrin clot properties and haemostatic function in men and women with type 1 diabetes. *Thromb Haemost* 2015; 113(2): 312-8.
211. Rooth E, Wallen NH, Blombäck M, He S. Decreased fibrin network permeability and impaired fibrinolysis in the acute and convalescent phase of ischemic stroke. *Thromb Res* 2011; 127: 51-6.
212. Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, et al. Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(11): 2567-73.
213. Piróg MM, Milewicz T, Jach R, Undas A. Plasma fibrin clot properties in postmenopausal women: effects of hormone therapy. *Menopause*. 2016; 23(5): 511-7.

214. McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD. Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40(6): 640-4.
215. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2009; 12(1): 29-33.
216. Bauerová K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18 Spec No: 15-20.
217. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109–42.
218. Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 105–28.
219. Ristic P, Srejovic I, Nikolic T, Stojic I, Ristic D, Zivkovic V, Jakovljevic VL. The effects of zofenopril on cardiac function and pro-oxidative parameters in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem* 2017; 426(1-2): 183-93.
220. Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A. Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 2011; 216(9): 1010-7.
221. Czarska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr* 2015; 66(3): 393-405.
222. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
223. Desai PB, Manjunath S, Kadi S, Chetana K, Vanishree J. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14(11): 959-67.
224. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 2005; 38(11): 981-6.
225. Pasupathi P, Deepa M, Rani P, Sankar RR. Circulating lipid peroxidation, plasma and erythrocyte antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 2009; 35(2): 57-62.
226. Veselinovic M, Barudic N, Vuletic M, Zivkovic V, Tomic-Lucic A, Djuric D, Jakovljevic V. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem* 2014; 391(1-2): 225-32.

227. Al Arfaj AS, Chowdhary AR, Khalil N, Ali R. Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol* 2007; 124: 83–89.
228. Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 275–7.
229. te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BC. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 67–73.
230. Mishra GD, Kuh D. Health symptoms during midlife in relation to menopausal transition: British prospective cohort study. *BMJ* 2012; 344: e402.
231. Li Q, Geng X, Zheng W, Tang J, Xu B, Shi Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci* 2012; 55: 659–69.
232. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The role of oxidative stress of female reproduction: A review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10: 1–32.
233. Wang Z, Chandrasena ER, Yuan Y, Peng KW, van Breemen RB, Thatcher GR, et al. Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/apyrimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens. *Chem Res Toxicol* 2010; 23: 1365–73.
234. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int* 2008; 28(4): 317–21.
235. Uppoor RB, Rajesh A, Srinivasan MP, Unnikrishnan B, Holla R. Oxidative Stress in Obese Postmenopausal Women: An Additive Burden for Atherosclerosis. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(12): OC03–OC5.
236. Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Pino LD, Costa MP, Marchese G, et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas* 2006; 53(1): 77–82.
237. Doshi SB, Agarwal A. The role of oxidative stress in menopause. *J Midlife Health* 2013; 4(3): 140–6.
238. Graf J, Scherzer R, Grunfeld C, Imboden J. Levels of C-reactive protein associated with high and very high cardiovascular risk are prevalent in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2009; 4(7): e6242.
239. Barry OP, Kazanietz MG, Praticò D, FitzGerald GA. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a

- protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 7545-56.
240. Miranda-Bautista J, Verdejo C, Díaz-Redondo A, Bretón I, Bellón JM, Pérez-Valderas MD, et al. Metabolic bone disease in patients diagnosed with inflammatory bowel disease from Spain. *Therap Adv Gastroenterol* 2019; 12: 1756284819862152.
241. Cai S, Yu H, Li Y, He X, Yan L, Huang X, et al. Bone mineral density measurement combined with vertebral fracture assessment increases diagnosis of osteoporosis in postmenopausal women. *Skeletal Radiol* 2019. doi: 10.1007/s00256-019-03280-3.
242. Nakano K, Okada Y, Tanaka Y. Secondary osteoporosis. Bone metabolic disorder in Rheumatoid arthritis. *Clin Calcium* 2018; 28(12): 1599-1603.
243. Ideguchi H, Ohno S, Hattori H, Senuma A, Ishigatsubo Y. Bone erosions in rheumatoid arthritis can be repaired through reduction in disease activity with conventional disease-modifying antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(3): R76.
244. Panagopoulos PK, Lambrou GI. Bone erosions in rheumatoid arthritis: recent developments in pathogenesis and therapeutic implications. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2018; 18(3): 304-19.
245. Arain SR, Riaz A, Nazir L, Umer TP, Rasool T. Low Bone Mineral Density Among Patients With Newly Diagnosed Rheumatoid Arthritis. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2016; 28(1): 175-8.
246. Oelzner P, Schwabe A, Lehmann G, Eidner T, Franke S, Wolf G, et al. Significance of risk factors for osteoporosis is dependent on gender and menopause in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2008; 28(11): 1143-50.
247. Sapir-Koren R, Livshits G. Postmenopausal osteoporosis in rheumatoid arthritis: The estrogen deficiency-immune mechanisms link. *Bone* 2017; 103: 102-15.
248. Sowers MR, Matthews KA, Jannausch M, Randolph JF, McConnell D, Sutton-Tyrrell K, et al. Hemostatic factors and estrogen during the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(11): 5942-8.
249. Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, Forsblad-d'Elia H, Carlsten H. Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335(1): 14-29.
250. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta* 2003; 338(1-2): 123-9.

БИОГРАФИЈА

1. ЛИЧНИ ПОДАЦИ

Име и презиме: Александра Вранић

Датум и место рођења: 29.07.1990. године, Крагујевац, Република Србија

Адреса: Немањина 7/24, Крагујевац

Телефон: 060/3393198

2. ОБРАЗОВАЊЕ

Медицинска школа са домом ученика „Сестре Нинковић“,

Медицински факултет у Крагујевцу, дипломирала 2014. године

3. ПОЗНАВАЊЕ СТРАНИХ ЈЕЗИКА

Енглески (напредни ниво)

4. РАДНО ИСКУСТВО

Асистент на предмету Клиничка фармација, Факултет медицинских наука,

Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац

5. РАЗНО

Учесница великог броја домаћих и иностраних конгреса.

БИБЛИОГРАФИЈА

РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА НА СС/SCI ЛИСТИ:

1. Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, Petkovic A, Jakovljevic V, Antovic A. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019. doi: 10.1007/s10067-019-04629-8
2. Smigic J, Sabo T, Vranic A, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN, Milosavljevic I, Poljarevic J, Krivokapic M, Bolevich S, Jakovljevic VLj. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. Mol Cell Biochem. 2019; 458(1-2): 89-98. doi: 10.1007/s11010-019-03533-8.
3. Vranic A, Simovic S, Ristic P, Nikolic T, Stojic I, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V, Djuric D. The acute effects of different spironolactone doses on cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. Can J Physiol Pharmacol. 2017; 95(11):1343-1350. doi: 10.1139/cjpp-2017-0055.
4. Pesic G, Jeremic J, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Vranic A, Bradic J, Ristic B, Matic A, Prodanovic N, Jakovljevic V. Interleukin-6 as possible early marker of stress response after femoral fracture. Mol Cell Biochem. 2017; 430(1-2): 191-199. doi: 10.1007/s11010-017-2967-3.

РАДОВИ ШТАМПАНИ У ЧАСОПИСИМА ЦИТИРАНИМ У EMBASE-У

1. Vranic A, Antovic A, Draginic N, Andjic M, Ravic M, Jakovljevic V, Veselinovic M. Redox Status in Women with Rheumatoid Arthritis. Ser J Exp Clin Res 2017; 1-1. doi: 10.2478/SJECR-2018-0047
2. Ravic M, Jakovljevic V, Ristic P, Srejovic I, Vranic A, Babic G, Bolevich S. The Effects of Valsartan on Cardiac Function and Pro-Oxidative Parameters in The Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Heart. Ser J Exp Clin Res 2017; 1-1. doi: 10.2478/SJECR-2018-0049
3. Pesic G, Jeremic J, Stojic I, Vranic A, Cankovic M, Nikolic T, Jeremic N, Matic A, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V. Redox status in patients with femoral neck fractures. Ser J Exp Clin Res. 2016; 17(3): 199 – 205. doi: 10.1515/sjecr-2015-0061

4. Popovic A, Pechanova O, Rehakova R, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Jeremic J, Vranic A , Jakovljevic V. Effects of provinols on cardiodynamics and coronary flow in isolated rat hearts. Ser J Exp Clin Res. 2016; 17(2): 99 – 105. doi: 10.1515/sjecr-2015-0060
5. Canović P, Vranic A, Petrovic S, Rakovic I, Popovska Jovicic B, Hamzagic n. Analysis of clinical, haematological and biochemical parameters in patients with infectious mononucleosis. Ser J Exp Clin Res. 2015; 16(4): 291 – 95. doi: 10.1515/SJECR-2015-0040
6. Plecevic S, Pechanova P, Barta A, Vranic A, Jeremic J, Arsenijevic Lj, Jeremic N, Jakovljevic V, Jevdjetic M, Stanojevic D. Effects of the direct renin inhibitor aliskiren on oxidative stress in isolated rat heart. Ser J Exp Clin Res. 2015; 16(3): 193 – 99. doi: 10.1515/SJECR-2015-0025

AUTHORS CURRICULUM VITAE

1. PERSONAL DATA

Name and surname: Aleksandra Vranić

Date and place of birth: 29.07.1990. Kragujevac, Serbia

Address: Nemanjina 7/24 Kragujevac

Phone: 060/3393198

2. EDUCATION

Medical school "Sestre Ninković",

Medical faculty University of Kragujevac, graduated - 2014.

3. FOREIGN LANGUAGE

English (advanced)

4. WORK EXPERIENCE

Assistant trainee at Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Medical Sciences,
University of Kragujevac Kragujevac

5. MISCELLANEOUS

Participant in large number of national and international congresses.

LIST OF PUBLICATIONS

ARTICLES PUBLISHED IN CC/SCI JOURNALS

1. Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, Petkovic A, Jakovljevic V, Antovic A. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019. doi: 10.1007/s10067-019-04629-8
2. Smigic J, Sabo T, Vranic A, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN, Milosavljevic I, Poljarevic J, Krivokapic M, Bolevich S, Jakovljevic VLj. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. Mol Cell Biochem. 2019; 458(1-2): 89-98. doi: 10.1007/s11010-019-03533-8.
3. Vranic A, Simovic S, Ristic P, Nikolic T, Stojic I, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V, Djuric D. The acute effects of different spironolactone doses on cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats. Can J Physiol Pharmacol. 2017; 95(11):1343-1350. doi: 10.1139/cjpp-2017-0055.
4. Pesic G, Jeremic J, Nikolic T, Zivkovic V, Srejovic I, Vranic A, Bradic J, Ristic B, Matic A, Prodanovic N, Jakovljevic V. Interleukin-6 as possible early marker of stress response after femoral fracture. Mol Cell Biochem. 2017; 430(1-2): 191-199. doi: 10.1007/s11010-017-2967-3.

ARTICLES PUBLISHED IN JOURNALS CITED IN EMBASE

1. Vranic A, Antovic A, Draginic N, Andjic M, Ravic M, Jakovljevic V, Veselinovic M. Redox Status in Women with Rheumatoid Arthritis. Ser J Exp Clin Res 2017; 1-1. doi: 10.2478/SJECR-2018-0047
2. Ravic M, Jakovljevic V, Ristic P, Srejovic I, Vranic A, Babic G, Bolevich S. The Effects of Valsartan on Cardiac Function and Pro-Oxidative Parameters in The Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Heart. Ser J Exp Clin Res 2017; 1-1. doi: 10.2478/SJECR-2018-0049
3. Pesic G, Jeremic J, Stojic I, Vranic A, Cankovic M, Nikolic T, Jeremic N, Matic A, Srejovic I, Zivkovic V, Jakovljevic V. Redox status in patients with femoral neck fractures. Ser J Exp Clin Res. 2016; 17(3): 199 – 205. doi: 10.1515/sjecr-2015-0061
4. Popovic A, Pechanova O, Rehakova R, Zivkovic V, Srejovic I, Jeremic N, Jeremic J, Vranic A, Jakovljevic V. Effects of provinols on cardiodynamics and coronary flow

- in isolated rat hearts. Ser J Exp Clin Res. 2016; 17(2): 99 – 105. doi: 10.1515/sjecr-2015-0060
5. Canović P, Vranic A, Petrovic S, Rakovic I, Popovska Jovicic B, Hamzagic n. Analysis of clinical, haematological and biochemical parameters in patients with infectious mononucleosis. Ser J Exp Clin Res. 2015; 16(4): 291 – 95. doi: 10.1515/SJECR-2015-0040
6. Plecevic S, Pechanova P, Barta A, Vranic A, Jeremic J, Arsenijevic Lj, Jeremic N, Jakovljevic V, Jevdjevic M, Stanojevic D. Effects of the direct renin inhibitor aliskiren on oxidative stress in isolated rat heart. Ser J Exp Clin Res. 2015; 16(3): 193 – 99. doi: 10.1515/SJECR-2015-0025

VIII
ПРИЛОЗИ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД: Монографска публикација

Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР: Докторска дисертација

Аутор – АУ: Александра Вранић

Ментор/коментор – МН: проф. др Александра Антовић и доц. др Мирјана Веселиновић

Наслов рада – НР: Циркулишуће микропартикуле и биомаркери оксидационог стреса код пацијената оболелих од реуматоидног артритиса

Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица

Језик извода – ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања – ЗП: Република Србија

Уже географско подручје – УГП: Централна Србија

Година – ГО: 2019. година

Издавач – ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса – МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физички опис рада – ФО: 188 страна, 9 слика, 57 табела, 54 графика

Научна област – УДК: Медицина

Научна дисциплина – ДИ:

Предметна одредница/ кључне речи – ПО:

Чува се – ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена – ВН:

Извод – ИД:

Увод: Реуматоидни артритис (РА) је хронична, инфламаторна, аутоимуна болест која узрокује синовитис и деструктивни артритис, прогресивно оштећење хрскавице и зглобова, деформитете праћене ван-зглобним, системским манифестацијама болести,

снажан системски инфламаторни одговор са убрзаним развојем атеросклерозе, као и инвалидитет, скраћени животни век и повећан морталитет.

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

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

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

Закључак: Микропартикуле које потичу од тромбоцита могу бити потенцијални биомаркер за тромбоцитну реактивност у РА која представља предиктор за настанак тромбозе и повећање кардиоваскуларног ризика. Параметри глобалних хемостатских метода могу бити корисни у дијагностиковању и праћењу хиперкоагулационог стања

код пацијената са РА. Код пацијената са реуматоидним артритисом постоји потреба за суплементацијом антиоксидансима.

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

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 31.01.2018.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

1. **Проф. др Владимир Јаковљевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Физиологија*, председник;
2. **Проф. др Небојша Анђелковић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Интерна медицина*, члан;
3. **Проф. др Милан Петронијевић**, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област *Интерна медицина*, члан.

KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number – ANO:

Identification number – INO:

Documentation type – DT: Monographic publication

Type of record – TR: Textual printed material

Contents code – CC: Ph. D. Thesis

Author – AU: Aleksandra Vranic

Menthor/co-mentor – MN:

Title – TI: Circulating microparticles and biomarkers of oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis

Language of text – LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication – LP: Central Serbia

Publication year – PY: 2019

Publisher – PU: Author reprint

Publication place – PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description – PD: 188 pages, 9 pictures, 57 tables, 54 charts

Scientific field – SF: Medicine

Scientific discipline – SD:

Subject/key words – SKW:

UDC:

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note – N:

Abstract – AB:

Introduction: Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic, inflammatory, autoimmune disease that causes synovitis and destructive arthritis, progressive cartilage and joints damage, deformities followed by outside of the articular manifestations, systemic disease

manifestations, a strong systemic inflammatory response with rapid development of atherosclerosis, disabilities, shortened life expectancy and increased mortality.

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

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

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

Conclusions: Platelet-derived microparticles could be a potential biomarker for platelet reactivity in RA, which is a predictor of thrombosis and increased cardiovascular risk. Global hemostatic methods can be useful in hypercoagulation diagnosing and monitoring in patients with RA. Furthermore, in patients with rheumatoid arthritis there is a need for supplements containing antioxidants.

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

Accepted by the Scientific Board on – ASB: 31th January 2018.

Defended on – DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:

1. **Full Professor Vladimir Jakovljevic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Physiology, chairman;
2. **Associate Professor Nebojsa Andjelkovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field Internal medicine, member;
3. **Full Professor Milan Petronijevic**, M.D, Ph.D, MMA Medical Faculty, University of Defence, Military Medical Academy, Belgrade, scientific field Internal medicine member

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александра Вранић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

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

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 25.09.2019. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александра Вранић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

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

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

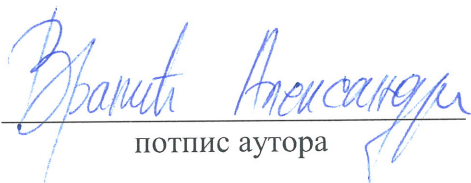
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 25.09.2019. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

1. Vranic A, Pruner I, Veselinovic M, Soutari N, Petkovic A, Jakovljevic V, Antovic A. Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2019. doi: 10.1007/s10067-019-04629-8
2. Smigic J, Sabo T, Vranic A, Zivkovic V, Srejovic I, Turnic TN, Milosavljevic I, Poljarevic J, Krivokapic M, Bolevich S, Jakovljevic VLj. Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin. Mol Cell Biochem. 2019; 458(1-2): 89-98. doi: 10.1007/s11010-019-03533-8.
3. Vranic A, Antovic A, Draginic N, Andjic M, Ravic M, Jakovljevic V, Veselinovic M. Redox Status in Women with Rheumatoid Arthritis. Ser J Exp Clin Res 2017; 1-1. doi: 10.2478/SJECR-2018-0047



Assessment of hemostatic disturbances in women with established rheumatoid arthritis

Aleksandra Vranic¹ · Iva Pruner² · Mirjana Veselinovic³ · Nida Soutari⁴ · Anica Petkovic¹ · Vladimir Jakovljevic^{5,6} · Aleksandra Antovic^{7,8}

Received: 9 April 2019 / Revised: 15 May 2019 / Accepted: 29 May 2019
© The Author(s) 2019

Abstract

Objectives This study was aimed to assess hemostatic disturbances in female patients with established rheumatoid arthritis (RA) in relation to menopausal status and disease activity.

Method Ninety women were included in the study, 42 patients and 48 age-matched healthy controls. There were no differences between the investigated groups regarding the presence of traditional cardiovascular risk factors. Two global hemostatic assays were employed, namely endogenous thrombin potential (ETP) and overall hemostasis potential (OHP). The parameters of the ETP assay (ETP, C-max, t-lag, t-max) and OHP assay (overall coagulation potential (OCP) and overall fibrinolytic potential (OFP)) were assessed. Moreover, the parameters of the fibrin clot (lag time, Max Abs, and slope) were measured by clot turbidity and scanning electron microscopy (SEM). Both patients and controls were divided into four subgroups according to menopause status.

Results The premenopausal controls differed significantly from all other subgroups in terms of diminished levels of ETP ($p = 0.02$), C-max ($p = 0.01$), OCP ($p = 0.02$), OHP ($p = 0.001$), and Max Abs ($p = 0.008$), while OFP ($p = 0.0001$) was increased. This tendency was not seen in the premenopausal RA patients compared with the postmenopausal RA patients. SEM images showed denser clots composed of thinner fibers in samples from RA patients. The disease activity measured by DAS28 correlated with OCP and OHP ($r = 0.54$; $p = 0.001$ and $r = 0.44$; $p = 0.003$, respectively) indicating persistent hypercoagulable condition in the whole group of RA patients.

Conclusions Our results point towards coagulation activation in premenopausal women with established RA. The patients were well characterized, which enabled assessment in a real-life setting.

Key Points

- Extensive assessment points towards persistent coagulation activation in premenopausal women with established rheumatoid arthritis.
- Impaired thrombin generation and fibrin formation are associated with menopause in healthy women, while rheumatoid arthritis closes the gap within patients regarding menopause.
- Fibrin morphology is unfavorably altered and fibrinolysis is decreased in patients with established rheumatoid arthritis.
- Increased activity of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) may contribute to impaired fibrinolysis in patients with rheumatoid arthritis.

Keywords Fibrin structure · Hemostasis · Menopause · Rheumatoid arthritis

✉ Aleksandra Antovic
aleksandra.antovic@ki.se

¹ Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

² Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

³ Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴ Clinical Chemistry, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

⁵ Faculty of Medical Sciences, Department of Physiology, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁶ 1st Moscow State Medical, University IM Sechenov, Department of Human Pathology, Moscow, Russia

⁷ Department of Medicine, Rheumatology Unit, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

⁸ Academic Specialist Center, Center for Rheumatology, Stockholm Health Services, Stockholm, Sweden

Introduction

In addition to the progressive disability secondary to the joint impairment, the increased risk of cardiovascular disease (CVD) is a major issue in patients with rheumatoid arthritis (RA) [1]. RA is associated with most subtypes of CVD, and ischemic heart disease (IHD) and in particular myocardial infarction has been most extensively studied [2]. The risk of IHD is increased in both men and women with RA, and it seems to develop rather rapidly after disease onset [3]. Despite improvements in RA treatment and improved disease control, the risk for IHD has remained constant over time [4]. Cardiovascular events are also a major cause of mortality in patients with RA [5], and recent studies point towards an increased risk of venous thromboembolism and cerebrovascular disease in RA [6, 7]. The association with traditional risk factors for CVD does not entirely explain the prevalence of premature atherosclerosis and prothrombotic condition in this group of patients [8, 9]. Disease-related risk factors that potentiate the inflammatory burden are also of importance, especially elevated levels of C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) [10, 11], as well as the presence of extra-articular manifestations [12], and high disease activity is associated with low functional status [13, 14]. The positivity for rheumatoid factor (RF) and antibodies to citrullinated protein antigens (ACPAs) has been associated with the risk of clinically significant CVD in RA [15–17].

Chronic systemic inflammation in RA shifts the hemostatic mechanisms in favor of thrombosis through activation of the coagulation system, inhibition of fibrinolysis, and decreased activity of anticoagulant pathways [18]. Inflammation and coagulation are closely related processes that significantly influence each other [19], and this interaction occurs at several levels, such as platelet activation, endothelial activation, the expression of adhesion molecules on endothelium, tissue factor expression on monocytes, excessive thrombin and fibrin formation, and formation of denser fibrin structures, as reviewed by Hoppe et al. [19]. Excessive accumulation of fibrin in the synovium, the vessel walls, and in other tissues represents a striking pathophysiological feature of RA.

Thus, the presence of prothrombotic condition due to persistent inflammatory stimulation in RA patients acts synergistically with traditional CVD risk factors and contributes to the increased CVD risk in RA. This is of particular importance knowing that RA occurs more commonly in women and frequently onsets in women of childbearing age, with a female to male ratio up to 4:1 in younger age groups, but nearing 1:1 after 60 years of age [20]. In addition, there is also significantly higher disease activity in the female population, with three times more rapid progression of RA-related disability than in men [21].

While the assessment of single hemostatic factors and/or inhibitors reveals only a small part of the complex hemostatic process, the new generation of global hemostatic assays offers

a complete overview of hemostasis. The most widely used global hemostatic assay is measurement of the endogenous thrombin potential (ETP), which reflects the total amount and the kinetics of thrombin generated over time in the examined plasma sample. The results of this test reliably reflect thrombotic or bleeding potential [22]. On the other hand, the overall hemostatic potential (OHP) assay provides additional information concerning the rates of fibrin formation and fibrin degradation, demonstrating the balance between these two opposing hemostatic processes [23]. The turbidimetric curve reflects fibrin formation and can be used to assess fibrin clot properties, and the fibrin degradation curve can be a useful tool for measuring the clot lysis time (CLT).

We aimed this study, therefore, to assess hemostatic disturbances in female patients with established RA using global hemostatic assays and to identify fibrin clot properties in relation to the presence of traditional risk factors for CVD, disease activity, and menopause status.

Material and methods

Study population

Forty-two women with established RA referred to the outpatient clinic, Department of Rheumatology, Clinical Centre Kragujevac, Serbia, were included in the study (mean age 54.8 ± 9.1 years). RA was diagnosed according to the classification criteria of the American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) 2010 [24]. The exclusion criteria included a history of diabetes mellitus, malignancy, inflammatory disease (inflammatory bowel diseases, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, vasculitis) except RA, liver or renal insufficiency, previous cerebrovascular or cardiovascular disorders (including inherited thrombophilia, antiphospholipid syndrome, and hyperhomocysteinemia), and venous thromboembolism. RA assessments included a detailed medical history, the presence of extra-articular disease, current disease activity assessed by the 28-point disease activity score (DAS28) [25], and physical function using the Health Assessment Questionnaire (HAQ) [26]. All current medications were recorded. Additionally, at the time of blood sampling, the patients were free of any medication known to influence hemostasis, and we ensured that no anticoagulants or antithrombotic agents (acetylsalicylic acid) were prescribed to these patients.

Forty-eight age and sex-matched healthy subjects (mean age 54.1 ± 6.2 years) were included in the study as controls. They were free from diabetes mellitus, malignancy, inflammatory disease including RA, and liver or renal insufficiency. All women included in the study were not taking oral contraceptives or hormone replacement treatment.

All hormone factors were self-reported by the participants. Post-menopausal status was defined as cessation of menses for 12 months, as previously described [27].

The study was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and principles of Good Clinical Practice (GCP). Written informed consent was obtained from all participants, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinical Center Kragujevac, Serbia, prior to the onset of the study.

Blood sampling

Following at least a 10-h fasting period, blood was collected in Vacutainer tubes containing 0.129 M sodium citrate (BD Vacutainer Blood Collection System) using 21-gauge needles (BD Vacutainer needles). Platelet-poor plasma was obtained within 60 min of sampling by centrifugation at 2000×g for 15 min at room temperature and stored at −70 °C. The frozen plasma samples were transported to the Karolinska Institutet, Clinical Chemistry–Coagulation, Department of Molecular Medicine and Surgery, Stockholm, Sweden, for further analysis.

Global hemostatic assays

Determination of endogenous thrombin potential

The ETP assay (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) was performed on a BCS® XP System according to the manufacturer's instructions. From the thrombin generation curves, we obtained the following four parameters: ETP (as a measure of the total endogenously generated thrombin), t_{lag} (lag phase until initiation), C_{max} (peak thrombin generation), and t_{max} (time to peak thrombin generation) (Fig. 1a). The ETP values were calculated as the area under the thrombin generation curve and given as a percentage (%). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CVs) for the normal plasma pool were 1.1% and 1.7%, while for the hypocoagulable plasma pool these were 1.8% and 3.9%, respectively.

Determination of overall hemostatic potential

We employed a modification of the assay described by He et al. [23] in order to assess OHP in plasma. Briefly, fibrin aggregation curves were constructed in the microplate using 140- μ L citrated plasma with the addition of 20 μ L of diluted phospholipid reagent (Phospholipid-TGT, Rossix, Sweden), 0.04-U/mL thrombin (Sigma-Aldrich, USA), and 17-mmol/L $CaCl_2$ with or without 300-ng/mL tissue plasminogen activator (t-PA) (Boehringer Ingelheim, Germany). Absorbance (Abs) at 405 nm was measured every 12 s for 60 min. The area under the curve was calculated by

summation of the Abs values (Abs-sum) and expressed as the OHP value (Fig. 1c). Two additional parameters were also analyzed—the overall coagulation potential (OCP), determined as the area under the fibrin aggregation curve obtained without the addition of t-PA (Fig. 1d), and the overall fibrinolysis potential (OFP), calculated as the difference between the two areas as $OFP (\%) = ((OCP - OHP)/OCP) \times 100$ (Fig. 1c). The intra-assay and inter-assay CVs for OHP were 1.6% and 6.8% and for OCP were 1.2% and 5.7%, respectively.

Determination of clot lysis time

CLT was determined based on the fibrin aggregation curve for the determination of OHP and was defined as the time from the midpoint of the clear-to-maximum turbid transition (which corresponds to the “clotting time”) to the midpoint of the maximum turbid-to-clear transition. CLT was measured before and after the addition of a specific inhibitor of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), potato tuber carboxypeptidase inhibitor (PTCI; final concentration 50 mg/mL) in order to indirectly determine the activity of TAFI (Fig. 1b).

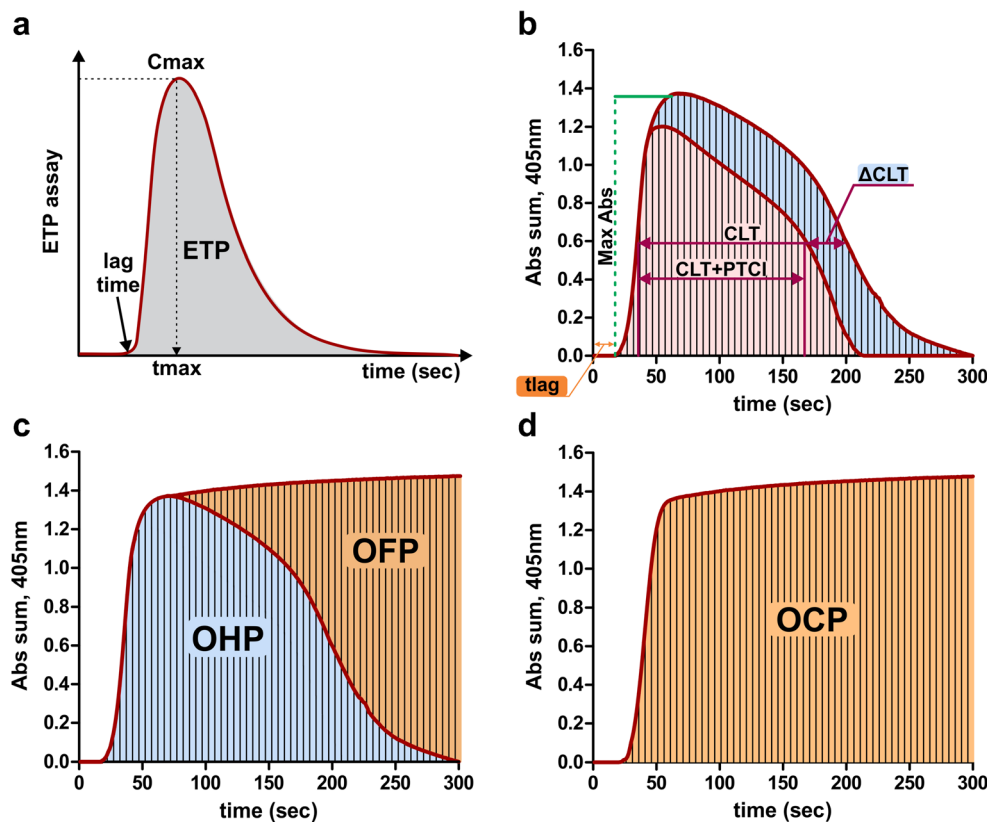
Analyses of fibrin clot formation

Fibrin clot density and the rates of fibrin polymerization were assessed with the turbidimetric clotting assay according to the method described by Carter et al. [28]. The turbidimetric curve for determination of OCP was used to assess (1) lag time, defined as the time to the starting point of detectable fibrin formation, (2) the slope at the steepest part of the fibrin polymerization curve, reflecting the rate of lateral aggregation and the fiber formation phase, and (3) the maximum absorbance (Max Abs) as a measure of the clot density, defined as the increase in absorbance from baseline to the maximum value (Fig. 1b).

Scanning electron microscopy

The clots formed during fibrin generation for the determination of OCP were washed with PBS (phosphate-buffered saline) solution and fixed in 2.5% glutaraldehyde in HEPES-buffered saline for 60 min at room temperature and stored at 4 °C. The samples were washed in distilled water and placed in 70% ethanol for 10 min, 95% ethanol for 10 min, absolute ethanol for 15 min, and in pure acetone for 10 min (all at room temperature) and then transferred to tetramethylsilane (Merck, Darmstadt, Germany) for 10 min and air dried. After drying, the samples were mounted on an aluminum stub and coated with carbon (Bal-Tec MED 010, Lichtenstein). Samples were analyzed under an Ultra 55 field emission scanning electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 3 kV.

Fig. 1 Schematic presentation of **a** endogenous thrombin potential (ETP). **b** clot lysis time with or without addition of potato tuber carboxypeptidase inhibitor (PTCI), **c** overall hemostasis potential (OHP) and overall fibrinolytic potential (OFP), and **d** overall coagulation potential (OCP). Abs, absorbance



Other laboratory analyses

Laboratory analyses of CRP (Beckman Coulter AU680 analyzer), ESR (Westergren method, Vacuette ESR analyzer), fibrinogen concentration (Clauss method, ACL TOP analyzer by Instrumentation Laboratory), lipid profile (cholesterol, triglycerides, HDL, and LDL, all by Beckman Coulter AU680 analyzer), RF (turbidimetric method, Beckman Coulter AU680 analyzer), and ACPA (Roche electrochemiluminescence immunoassay, Cobas e411 analyzer) were performed in the Central Laboratory of the Clinical Center Kragujevac.

Statistical analysis

All data were analyzed using SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011) and GraphPad Prism 5 (Version for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The results are expressed as means \pm standard deviation of the mean (SD), as medians with ranges and 95% confidence intervals, or as percentages depending on the data type and distribution. Distribution of the data was checked by the Shapiro–Wilk test. Independent samples *t* tests (parametric) and Mann–Whitney *U* tests (non-parametric) were used to assess the difference in estimated variables between groups. For comparison of more than two groups of individuals, one-way ANOVA was used. A *p* value < 0.05 was regarded as statistically significant.

Correlation between variables was examined using the Pearson and Spearman correlation analyses depending on the data type and distribution.

Results

Characteristics of the study population

The mean disease duration in patients was 12.8 ± 8.0 years, and disease activity was medium to high (DAS28 was 3.8 ± 1.1) at the moment of blood sampling. The mean HAQ value was 1.3 ± 0.2 , and the majority of patients were RF positive ($n = 36$; 86%) and ACPA positive ($n = 40$; 95%). All patients were treated with the standard treatment protocol of methotrexate (15–25 mg per week) and prednisolone (≤ 10 mg per day); however, only 9 patients (20%) were in remission (DAS28 < 2.5). Five patients had extra-articular manifestations in form of rheumatoid nodules on the elbows and the small joints of the hands.

There were no differences between the controls and RA patients regarding the presence of traditional CVD risk factors of smoking (42% vs 41%), hypertension (37.5% vs. 42.8%), and body-mass index (BMI) (26.1 ± 3.9 kg/m² vs. 26.1 ± 4.9 kg/m²) or regarding lipid profile, including cholesterol (6.5 ± 1.2 mmol/L vs. 6.1 ± 1.0 mmol/L), triglycerides (1.5 ± 0.6 mmol/L vs. 1.5 ± 0.6 mmol/L), HDL (1.6 ± 0.3 mmol/L

vs. 1.5 ± 0.3 mmol/L), and LDL (4.2 ± 1.1 mmol/L vs. 3.8 ± 0.9 mmol/L).

As expected, patients with RA had higher CRP (11.5 ± 6.4 mg/L vs. 2.5 ± 2.4 mg/L, $p = 0.0001$), ESR (22.9 ± 13.5 mm/h vs. 13.3 ± 8.8 mm/h, $p = 0.0001$), and fibrinogen levels (3.5 ± 0.7 g/L vs. 3.2 ± 0.5 g/L, $p = 0.031$) compared with controls.

Women in both groups were divided into the following four different subgroups according to menopause: (1) premenopausal controls ($n = 14$), (2) postmenopausal controls ($n = 34$), (3) premenopausal patients ($n = 11$), and (4) postmenopausal patients ($n = 31$). The oldest menstruating control was 53 years old, and the youngest menopausal woman with RA was 45 years old. The postmenopausal controls had a mean cessation of menses of 8.2 ± 4.1 years, while in the postmenopausal patient group it was 9.3 ± 4.5 years, but this difference was not statistically significant.

Demographic and clinical characteristics of the participants as well as the presence of traditional CVD risk factors in these subgroups are presented in Table 1. Premenopausal women in subgroups 1 and 3 had lower BMI, LDL, and total cholesterol levels compared with postmenopausal women in subgroups 2 and 4. The levels of CRP, ESR, and fibrinogen were lower in

premenopausal controls compared with postmenopausal women in the control group, but the difference ceased to exist in the RA group, as presented in Table 1.

Hemostatic parameters

The levels of the investigated parameters of the global hemostatic assays and the fibrin clot parameters did not differ between the controls and RA patients on the group level.

ETP levels were significantly higher in postmenopausal controls ($p = 0.023$) and were higher in both subgroups of RA patients compared with the levels in subgroup 1, but these differences were not statistically significant (Table 2). The levels of C-max, reflecting the maximum thrombin generation, had the same trend. Other parameters of the thrombin generation assay showed similar levels in the investigated subgroups. The parameters of thrombin generation were not correlated to the disease duration, or to the disease activity in the investigated patients with RA.

OHP (sum-Abs) was significantly lower ($p = 0.001$; $p = 0.04$; $p = 0.03$, respectively), while OFP (%) was significantly higher ($p = 0.0001$; $p = 0.006$; $p = 0.001$, respectively) in premenopausal controls (subgroup 1) compared with

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the study population

Subjects characteristics	Healthy controls		Rheumatoid patients	
	Premenopausal control (1)	Postmenopausal control (2)	Premenopausal patient (3)	Postmenopausal patient (4)
Number of patients	14	34	11	31
Average age	47.0 ± 2.9 ^{a***, c**}	57.1 ± 4.7 ^{d**}	43.6 ± 6.2 ^{f**}	58.8 ± 6.1
BMI (kg/m ²)	24.1 ± 3.2 ^{a*, c*}	27 ± 3.9 ^{d*}	23.6 ± 4.7 ^{f*}	27.1 ± 4.7
Disease duration (years)	/	/	11.6 ± 8.4	13.2 ± 7.9
DAS28	/	/	3.6 ± 1.4	3.8 ± 1.0
HAQ	/	/	1.21 ± 0.21	1.27 ± 0.26
RF positive, n (%)	/	/	10 (90.9)	26 (72.2)
ACPA positive, n (%)	/	/	11 (100)	29 (93.5)
Smokers n (%)				
Current smokers	7 (50)	14 (41.2)	5 (45.5)	12 (38.7)
Non-smokers	6 (42.9)	13 (38.2)	6 (54.5)	13 (41.9)
Past smokers	1 (7.1)	7 (20.6)	/	6 (19.4)
Cholesterol (mmol/L)	5.8 ± 1.0 ^{a***}	6.8 ± 1.2 ^{d**}	5.5 ± 0.9 ^{f*}	6.3 ± 1
Triglycerides (mmol/L)	1.4 ± 0.4	1.4 (0.7–3.9)	1.4 (0.7–3.3)	1.6 ± 0.7
HDL (mmol/L)	1.6 ± 0.3	1.6 (1.2–2.5) ^{d*}	1.3 (1.1–2.0)	1.5 ± 0.3
LDL (mmol/L)	3.5 ± 0.9 ^{a***}	4.5 ± 1.1 ^{d***, c**}	3.5 ± 0.8	3.9 ± 1
ESR (mm/h)	11.2 ± 10.3 ^{b***, c**}	14.2 ± 8.1 ^{d*, e**}	25.3 ± 15.1	22.1 ± 13.1
CRP (mg/L)	1.8 ± 1.1 ^{b***, c**}	2.8 ± 2.7 ^{d***, e*}	11.6 ± 17.2	6.7 ± 9.2
Fibrinogen (g/L)	3.08 ± 0.59 ^{b**}	3.34 ± 0.48 ^{d*}	3.77 ± 0.57	3.47 ± 0.72

The values are expressed as means \pm SD, or median (range), or number (percent) where is necessary. BMI, body mass index; DAS28, Disease Activity Score 28; HAQ, Health Assessment Questionnaire; RF, rheumatoid factor; ACPA, citrullinated protein antigen; CRP, C-reactive protein; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein. Single asterisk indicates statistical significance ($p < 0.05$); double asterisks indicate statistical significance ($p < 0.01$). Statistical significance between groups: ^a 1 and 2; ^b 1 and 3; ^c 1 and 4; ^d 2 and 3; ^e 2 and 4; ^f 3 and 4

Table 2 Parameters of global hemostatic methods in study population

Parameters	Healthy controls		Rheumatoid patients	
	Premenopausal control (1)	Postmenopausal control (2)	Premenopausal patient (3)	Postmenopausal patient (4)
OHP (Abs-sum)	116.2 ± 36.4 ^{a**,b*,c*}	155.9 ± 32.3	151.5 ± 44.7	146.4 ± 42
OCP (Abs-sum)	338 ± 42.1 ^{b*}	372 ± 40.8	362.7 ± 68.7	358.1 ± 59.8
OFP (%)	66.7 ± 6.6 ^{a**,b**,c**}	57.6 ± 7.3	58.6 ± 6.1	60.1 (38.1–70.0)
ETP AUC (%)	93.1 ± 8 ^{a*}	99.1 ± 7.8	97.9 ± 7.9	97 ± 10.5
ETP Cmax (%)	102.4 ± 6.3 ^{a*}	109.8 ± 9.3 ^{c*}	105.9 ± 8.8	104 ± 11
ETP tlag (sec)	21.5 ± 1.8	22 ± 2.3	23.4 ± 5.7	21.5 ± 3
ETP tmax (sec)	67.4 ± 10.5	65.7 ± 12.3	63.9 ± 8.7	67.5 ± 14.9
CLT (sec)	20.2 ± 3.7 ^{a*,b*,c*}	24.9 (19.0–34.3)	24.8 ± 3.2	23.5 (19.8–36.7)
CLT PTCI (sec)	16.7 ± 3 ^{a*}	18.8 ± 2.9 ^{c*}	18.1 ± 3.8	17.1 ± 3
ΔCLT	4.3 ± 2 ^{a*,b*,c**}	5.9 ± 2.9	6.13 ± 3.3	6.9 ± 3.7
FC lag time (sec)	262.3 ± 60.2 ^{a**,b*,c*}	290.4 ± 51.8	330.5 ± 96.2	332.1 ± 100.3
FC Max Abs	1.6 ± 0.2 ^{a**,b*,c*}	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2
FC Slope	76.4 ± 24.8	79.3 ± 31.1 ^{d*,e*}	61.8 ± 27.9	65.4 ± 23

The values are expressed as means ± SD, or median (range). *OHP*, overall hemostasis potential; *OCP*, overall coagulation potential; *OFP*, overall fibrinolytic potential; *ETP*, endogenous thrombin potential, *AUC*, area under curve (referent value 87–128); *Cmax*, maximal thrombin concentration (referent values 82–119); *tlag*, time to beginning of thrombin formation; *tmax*, time to maximal thrombin concentration; *CLT*, clot lysis time; *PTCI*, potato tuber carboxypeptidase inhibitor; Δ *CLT*, difference between CLT with PTCl and CLT without PTCl; *lag time*, time to starting point of detectable fibrin formation; *maxAbs*, increase in absorbance from baseline to maximum value; *slope*, the rate of lateral aggregation and fiber formation phase. Single asterisk indicates statistical significance ($p < 0.05$); double asterisks indicate statistical significance ($p < 0.01$). Statistical significance between groups: ^a 1 and 2; ^b 1 and 3; ^c 1 and 4; ^d 2 and 3; ^e 2 and 4; ^f 3 and 4

postmenopausal controls and to pre- and postmenopausal patients (subgroups 2–4). OCP (sum-Abs) was significantly lower in subgroup 1 compared with subgroup 2 ($p = 0.018$) (Table 2). When adjusted for BMI, the levels of all investigated parameters remained significantly different.

Typical fibrin aggregation curves for OCP and OHP in subjects from all investigated subgroups are presented on Fig. 2, demonstrating augmented fibrin aggregation (Figs. 2a) and diminished fibrinolysis (Fig. 2b) in patients compared with controls.

CLT was shorter in premenopausal controls compared with postmenopausal controls ($p = 0.007$) and RA patients ($p = 0.002$ and $p = 0.0001$, respectively, for both subgroups). After the addition of PTCl in the investigated samples, CLT remained significantly different between subgroups 1 and 2 ($p = 0.03$)

(Table 2). The difference in CLT before and after PTCl addition (Δ CLT) reflects the activity of TAFI in the investigated samples (Fig. 1b). Compared with premenopausal controls, Δ CLT was greater in postmenopausal controls ($p = 0.03$) and in both subgroups of RA patients ($p = 0.018$ and $p = 0.009$, respectively), reflecting higher TAFI activity in these samples.

Levels of OCP and OHP correlated ($r = 0.54$; $p = 0.001$ and $r = 0.44$; $p = 0.003$, respectively) with the disease activity in RA patients as measured by the DAS28 (Fig. 3a). Significant correlation was also observed with the levels of inflammatory parameters CRP ($r = 0.45$; $p = 0.003$ for OCP and $r = 0.46$; $p = 0.002$ for OHP) and ESR ($r = 0.65$; $p = 0.0001$ for OCP and $r = 0.65$; $p = 0.0001$ for OHP). OFP was inversely correlated with Δ CLT ($r = -0.47$, $p = 0.002$; Fig. 3b) in RA patients, indicating that diminished fibrinolysis is related to increased TAFI activity.

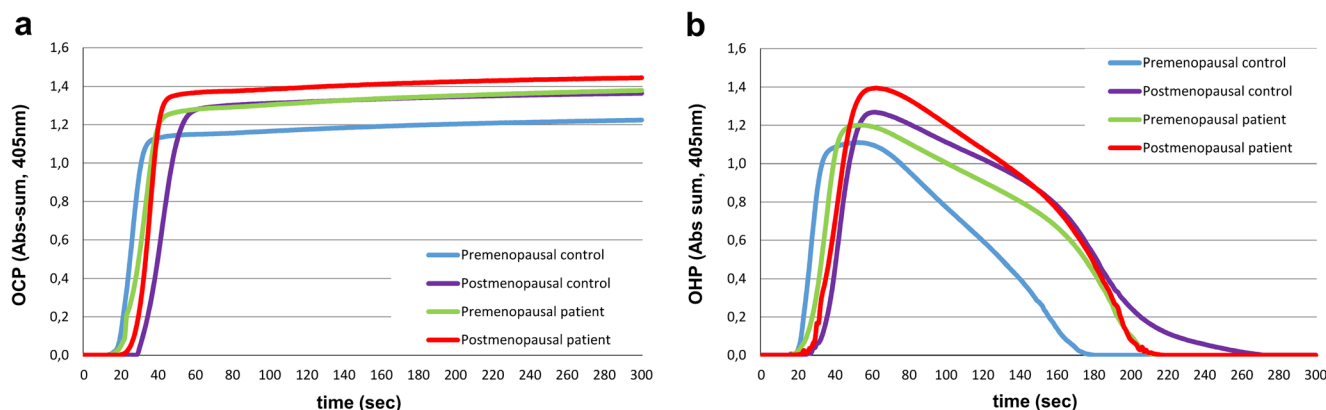
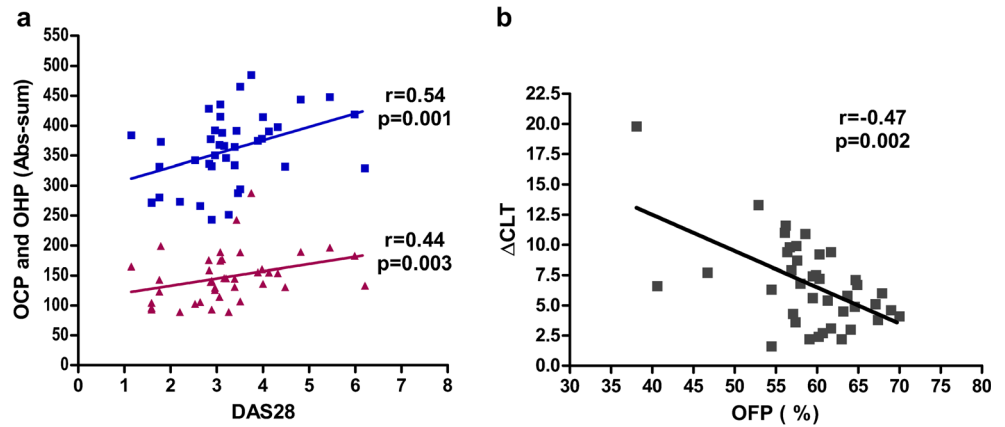


Fig. 2 Representative curves of fibrin formation for the assay of **a** overall coagulation potential (OCP) and **b** fibrin formation and fibrinolysis for the assay of overall hemostatic potential (OHP) in control subjects and patients with RA

Fig.3 **a** Correlation between RA activity measured by DAS 28 and overall coagulation potential (OCP, blue) as well as overall hemostatic potential (OHP, red) in 42 patients with RA; **b** correlation between overall fibrinolysis potential (OFP) and differences in clot lysis time before and after addition of TAFI-inhibitor (Δ CLT)



Analysis of fibrin clot parameters and clot structure

Parameters of fibrin clot formation indicated significantly shorter lag-time and lower Max Abs values in premenopausal controls compared with postmenopausal controls and to pre- and postmenopausal patients (Table 2). The slope of fibrin formation did not differ between control subgroups or between RA subgroups, but the slope values were higher in controls compared with patients (Table 2).

Scanning electron microscopy revealed that fibrin clots in premenopausal controls had larger pores with lower density, a so-called “looser” structure that is more susceptible to fibrinolysis (Fig. 4; 1a, b). Postmenopausal controls (Fig. 4; 2a, b) and both premenopausal (Fig. 4; 3a, b) and postmenopausal RA patients (Fig. 4; 4a, b) had denser fibrin structures with smaller pores. In these clots, fibers are tightly packed and are less prone to fibrinolysis.

Measurement of the fiber thickness of the representative samples was performed in five different areas, and the mean value of 10 fibers/area was used as the final measure of fiber thickness in these samples. Thicker fibers were found in the controls compared with patients (subgroup 1; 148.2 nm \pm 5.9 nm and subgroup 2; 132.6 \pm 18.2 nm vs. subgroup 3; 120.6 \pm 12.9 nm and subgroup 4; 127.1 \pm 8.1 nm).

Discussion

We have explored hemostatic disturbances in women with established RA using two global hemostatic assays, and we have evaluated the fibrin clot structures in these patients. All results were compared with the results obtained from healthy age-matched women as well as within the groups regarding menopause status. Premenopausal healthy women had

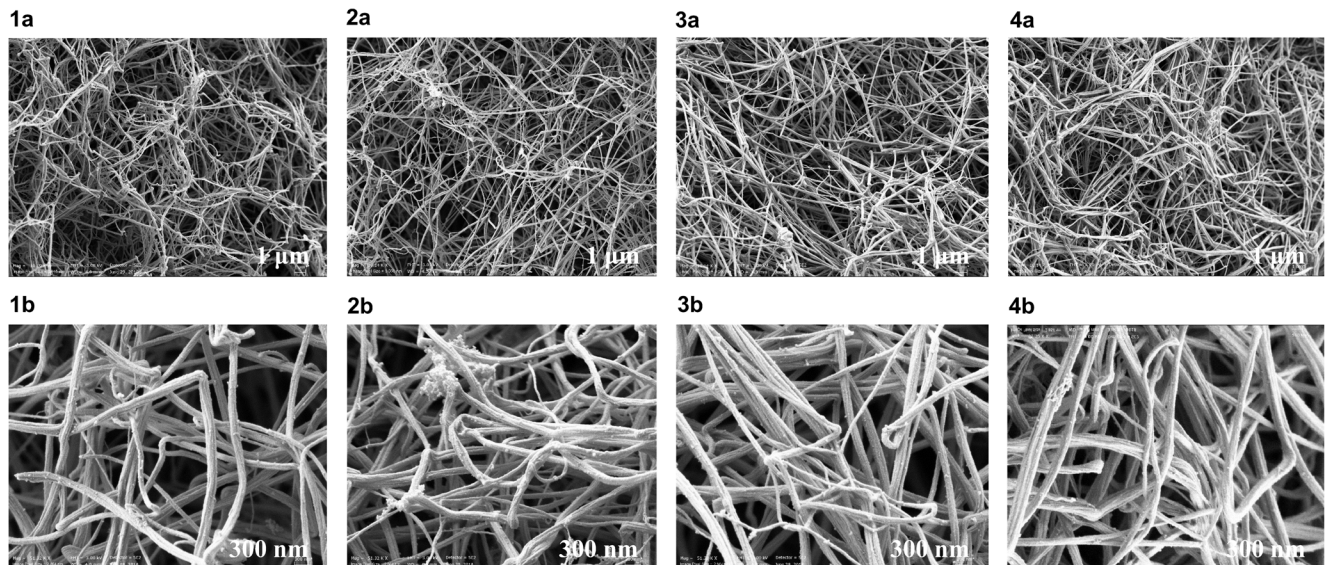


Fig. 4 Scanning electron microscopic images (SEM) of representative fibrin clots in investigated subjects. 1. Premenopausal control; 2. postmenopausal control; 3. premenopausal RA patient; 4.

postmenopausal RA patient. The magnification 1 μ m was used for Figs. 1, 2, 3, and 4a and 300 nm for Figs. 1, 2, 3, and 4b

reduced thrombin and fibrin formation, looser fibrin structure, and increased fibrinolysis compared with postmenopausal healthy controls. There were no significant differences between pre- and postmenopausal patients with RA. These findings might indicate that the inflammatory burden in women with RA activates hemostasis and closes the gap between pre- and postmenopausal RA patients regarding hemostatic activation.

The major advantage of our study is the extensive investigation of hemostatic parameters in a homogenous group of RA patients in comparison with strictly matched control subjects. This is of particular importance knowing that the CVD risk profile is altered in menopausal women [29]. Moreover, the levels of single coagulation factors increase, while the levels of natural anticoagulants decline with menopause in healthy women [30]. Regarding RA, the risk for disease onset is associated with an earlier age at menopause [31], and the postmenopausal period is related to higher disease activity and more rapid progression of disability [32, 33].

The lack of differences between the investigated parameters on the group level is probably due to ongoing treatment in patients with RA with standard protocols, including low doses of glucocorticoids and methotrexate. Treatment with methotrexate has been associated with a decreased risk of cardiovascular events [34], whereas assessments of the impact of glucocorticoid usage on CVD risk in patients with RA have yielded inconclusive results [35]. With regard to the effect on single coagulation parameters, no comprehensive data have been reported on the effect of RA therapies such as DMARDs and biologic agents, including TNF inhibitors. Studies in patients with RA treated with infliximab found reduced expression of proinflammatory cytokines together with reduced levels of fibrinogen and D-dimer and normalized levels of tissue-type plasminogen activator t-PA and plasminogen activator inhibitor-1 in these patients during follow-up of treatment [36, 37]. These findings support the notion that expression of hemostatic markers changes during immune activation and is likely to normalize in response to therapy.

Only a few studies have investigated hemostatic balance by means of global hemostatic assays. Undas et al. explored thrombin generation capacity and indicated delayed but augmented thrombin bursts in samples from RA patients, mainly owing to enhanced coagulation factor VIII in these patients [38]. In contrast, the results of Kern et al. showed earlier and accelerated formation of a reduced amount of thrombin in a homogenous group of RA patients compared with healthy controls [39]. In addition, our data demonstrate lower levels of generated thrombin and peak of thrombin generation in premenopausal controls compared with postmenopausal controls and RA patients. Within the RA group, no correlations were observed between the investigated parameters of thrombin generation and disease activity, disease duration, or inflammatory markers such as CRP and ESR. Once again, this

might be a consequence of the ongoing immunosuppressive treatment modulating the hemostatic response in the investigated group of patients. Taken together, the observed changes in thrombin generation in these studies are important and might be considered as an important aspect of the procoagulant state in RA.

The levels of the investigated parameters of overall hemostatic potential assay (OCP and OHP) correlated with disease activity in RA patients. The assay is based on fibrin aggregation and lysis, reflecting the total amount of fibrin formed in the investigated samples, and on its susceptibility to lysis. Fibrin formation is the final product of the coagulation process, but also an important step in early immunopathogenesis in the RA synovium, and fibrin is the most abundant antigen in the synovial compartment that can undergo citrullination and act as an autoantigen. In addition, the generation of a stable fibrin network is necessary to control the inflammatory process because fibrin clots act as a migratory matrix for various cell types such as macrophages [40].

The formation of tighter fibrin clots is connected with increased risk for CVD because these clots are less prone to fibrinolysis [41]. Menopause also seems to be related to the formation of prothrombotic fibrin clots [42], and Kwasny-Krochin et al. demonstrated lower clot permeability and denser fibrin structure in RA patients compared with control samples [43]. Accordingly, we found an unfavorably altered fibrin morphology in RA patients with a compact structure composed of thinner fibers and with smaller intrinsic pores, especially when compared with the premenopausal control sample. These clots are difficult to lyse, which is reflected by diminished OFP and prolonged CLT in the investigated samples from RA patients. Further explanation for reduced fibrinolysis can be found in the augmented TAFI activity demonstrated in our study. TAFI is carboxypeptidase B, an enzyme involved in the cross-talk between coagulation and fibrinolysis, but it also plays a critical role in inflammatory processes as a complement inhibitor [44]. In a mouse model of autoimmune arthritis, TAFI exerted anti-inflammatory effects by cleaving C5a, which is the final product of the complement cascade [44]. Thus, TAFI activation due to increased thrombin generation in RA inhibits fibrinolysis, but it might also reduce the inflammatory burden in RA. Further studies are needed to confirm this dual role of TAFI.

In summary, this extensive assessment points towards persistent coagulation activation in premenopausal women with established RA. The major limitation of our study is small number of investigated subjects. However, the patients were well characterized for the presence of traditional CVD risk factors and ongoing medications and had moderate to high disease activity, thus enabling an assessment in a real-life setting. Premenopausal patients with established RA had impaired fibrin structure compared with control subjects, and it resembled the clot structure in postmenopausal patients. Larger studies are needed to confirm these preliminary findings.

Compliance with ethical standards

Disclosures None.

Informed consent The study was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and principles of Good Clinical Practice (GCP). Written informed consent was obtained from all participants, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinical Center Kragujevac, Serbia, prior to the onset of the study.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Lauper K, Gabay C (2017) Cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 39:447–449. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0632-2>
- Solomon DH, Goodson NJ, Katz JN, Weinblatt ME, Avorn J, Setoguchi S, Canning C, Schneeweiss S (2006) Patterns of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:1608–1612. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.050377>
- Holmqvist ME, Wedren S, Jacobsson LT et al (2010) Rapid increase in myocardial infarction risk following diagnosis of rheumatoid arthritis amongst patients diagnosed between 1995 and 2006. *J Intern Med* 268:578–585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02260.x>
- Holmqvist M, Ljung L, Askling J (2017) Acute coronary syndrome in new-onset rheumatoid arthritis: a population-based nationwide cohort study of time trends in risks and excess risks. *Ann Rheum Dis* 76:1642–1647. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-211066>
- Goodson N, Marks J, Lunt M, Symmons D (2005) Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. *Ann Rheum Dis* 64:1595–1601. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.034777>
- Wolfe F, Freundlich B, Straus WL (2003) Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30:36–40
- Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K (2012) Autoimmune diseases and venous thromboembolism: a review of the literature. *Am J Cardiovasc Dis* 2:171–183
- Boyer JF, Gourraud PA, Cantagrel A, Davignon JL, Constantin A (2011) Traditional cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Joint Bone Spine* 78:179–183. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2010.07.016>
- Baghdadi LR, Woodman RJ, Shanahan EM, Mangoni AA (2015) The impact of traditional cardiovascular risk factors on cardiovascular outcomes in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 10:e0117952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117952>
- Wallberg-Jonsson S, Johansson H, Ohman ML, Rantapaa-Dahlqvist S (1999) Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis. A retrospective cohort study from disease onset. *J Rheumatol* 26:2562–2571
- Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Diaz MJ, Piñeiro A, Garcia-Porrúa C, Miranda-Filloo JA, Ollier WER, Martin J, Llorca J (2007) HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 57:125–132. <https://doi.org/10.1002/art.22482>
- Turesson C, McClelland RL, Christianson TJ, Matteson EL (2007) Severe extra-articular disease manifestations are associated with an increased risk of first ever cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:70–75. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.052506>
- Radovits BJ, Popa-Diaconu DA, Popa C, Eijsbouts A, Laan RFJM, van Riel PLCM, Fransen J (2009) Disease activity as a risk factor for myocardial infarction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68:1271–1276. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.089862>
- Farragher TM, Lunt M, Bunn DK, Silman AJ, Symmons DP (2007) Early functional disability predicts both all-cause and cardiovascular mortality in people with inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. *Ann Rheum Dis* 66:486–492. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.056390>
- Ajeganova S, Andersson ML, Frostegard J, Hafstrom I (2013) Disease factors in early rheumatoid arthritis are associated with differential risks for cardiovascular events and mortality depending on age at onset: a 10-year observational cohort study. *J Rheumatol* 40:1958–1966. <https://doi.org/10.3899/jrheum.130365>
- Liang KP, Maradit Kremers H, Crowson CS et al (2009) Autoantibodies and the risk of cardiovascular events. *J Rheumatol* 36:2462–2469. <https://doi.org/10.3899/jrheum.090188>
- Lopez-Longo FJ, Oliver-Minarro D, De La Torre I et al (2009) Association between anti-cyclic citrullinated peptide anti-bodies and ischemic heart disease in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 61:419–424. <https://doi.org/10.1002/art.24390>
- Van den Oever IA, Sattar N, Nurmohamed MT (2014) Thromboembolic and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: role of the hemostatic system. *Ann Rheum Dis* 73:954–957. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204767>
- Hoppe B, Dörner T (2012) Coagulation and the fibrin network in rheumatic disease: a role beyond hemostasis. *Nat Rev Rheumatol* 8:738–746. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.184>
- Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JAE, Stampfer MJ, Curhan GC (2003) Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 107:1303–1307. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000054612.26458.B2>
- Sokka T, Toloza S, Cutolo M, Kautiainen H, Makinen H, Gogus F, Skacic V, Badsha H, Peets T, Baranaukaite A, Géher P, Ujjfalussy I, Skopouli FN, Mavrommati M, Alten R, Pohl C, Sibilia J, Stancati A, Salaffi F, Romanowski W, Zarowny-Wierzbinska D, Henrohn D, Bresnihan B, Minnock P, Knudsen LS, Jacobs JW, Calvo-Alen J, Lazovskis J, Pinheiro Gda R, Karateev D, Andersone D, Rexhepi S, Yazici Y, Pincus T, QUEST-RA Group (2009) Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* 11(1):R7. <https://doi.org/10.1186/ar2591>
- Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Beguin S (2006) Thrombin generation, a function test of the hemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 96:553–561
- He S, Antovic A, Blombäck M (2001) A simple and rapid laboratory method for determination of hemostasis potential in plasma – II Modifications for use in routine laboratories and research work. *Thromb Res* 103:355–361. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(01\)00332-2](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(01)00332-2)
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK,

- Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69:1580–1588. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138461>
25. Prevoost ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38:44–48. <https://doi.org/10.1002/art.1780380107>
 26. Kirwan JR, Reeback JS (1986) Stanford health assessment questionnaire modified to assess disability in British patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 25:206–209. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/25.2.206>
 27. Phipps AI, Ichikawa L, Bowles EJ et al (2010) Defining menopausal status in epidemiologic studies: a comparison of multiple approaches and their effects on breast cancer rates. *Maturitas* 67:60–66. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.04.015>
 28. Carter AM, Cymbalista CM, Spector TD, Grant PJ, EuroCLOT Investigators (2007) Heritability of formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2783–2789. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.153221>
 29. Newson L (2018) Menopause and cardiovascular disease. *Post Reprod Health* 24(1):44–49. <https://doi.org/10.1177/2053369117749675>
 30. Renda G, Patti G, Lang IM, Siller-Matula JM, Hylek EM, Ambrosio G, Haas S, de Caterina R, Working Group on Thrombosis of the Italian Society of Cardiology (2019) Thrombotic and hemorrhagic burden in women: gender-related issues in the response to antithrombotic therapies. *Int J Cardiol* S0167-5273(18):35120–35129. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.02.004>
 31. Pikwer M, Bergström U, Nilsson JA, Jacobsson L, Turesson C (2012) Early menopause is an independent predictor of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 71:378–381. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.200059>
 32. Kuiper S, van Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, da Silva JA, van Riel PL (2001) Influence of sex, age, and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28:1809–1816
 33. Mollard E, Pedro S, Chakravarty E, Clowse M, Schumacher R, Michaud K (2018) The impact of menopause on functional status in women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 57:798–802. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex526>
 34. Westlake S, Colebatch A, Baird J et al (2010) The effect of methotrexate on cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)* 49:295–307. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep366>
 35. Ruyssen-Witrand A, Fautrel B, Saraux A, Le Loet X, Pham T (2011) Cardiovascular risk induced by low-dose corticosteroids in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Joint Bone Spine* 78:23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2010.02.040>
 36. Ingegneroli F, Fantini F, Griffini S, Soldi A, Pl M, Cugno M (2010) Anti-tumor necrosis factor alpha therapy normalizes fibrinolysis impairment in patients with active rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 28:254–257
 37. Agirbasli M, Inanc N, Baykan OA, Direskeneli H (2006) The effects of TNF alpha inhibition on plasma fibrinolytic balance in patients with chronic inflammatory rheumatic disorders. *Clin Exp Rheumatol* 24:580–583
 38. Undas A, Gissel M, Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Mann KG, Brummel-Ziedins KE (2010) Thrombin generation in rheumatoid arthritis: dependence on plasma factor composition. *Thromb Haemost* 104:224–230. <https://doi.org/10.1160/TH10-02-0091>
 39. Kern A, Balog A, Dulic S, Barabás E, Kiszalák M, Vásárhelyi B (2016) Alterations of the thrombin generation profile in rheumatoid arthritis. *J Thromb Thrombolysis* 41:359–364. <https://doi.org/10.1007/s11239-015-1251-1>
 40. Lanir N, Ciano PS, Van de Water L, McDonagh J, Dvorak AM, Dvorak HF (1988) Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *J Immunol* 140:2340–2349
 41. Collet JP, Allali Y, Lesty C, Tanguy ML, Silvain J, Ankri A, Blanchet B, Dumaine R, Gianetti J, Payot L, Weisel JW, Montalescot G (2006) Altered fibrin architecture is associated with hypofibrinolysis and premature coronary atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2567–2573. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000241589.52950.4c>
 42. Piróg MM, Milewicz T, Jach R, Undas A (2016) Plasma fibrin clot properties in postmenopausal women: effects of hormone therapy. *Menopause* 23:511–517. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000585>
 43. Kwasny-Krochin B, Gluszko P, Undas A (2010) Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis. *Thromb Res* 126(1):e11–e16. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.04.007>
 44. Song JJ, Hwang I, Cho KH, Garcia MA, Kim AJ, Wang TH, Lindstrom TM, Lee AT, Nishimura T, Zhao L, Morser J, Nesheim M, Goodman SB, Lee DM, Bridges SL Jr, Gregersen PK, Leung LL, Robinson WH (2011) Plasma carboxypeptidase B downregulates inflammatory responses in autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 121(9):3517–3527. <https://doi.org/10.1172/JCI46387>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

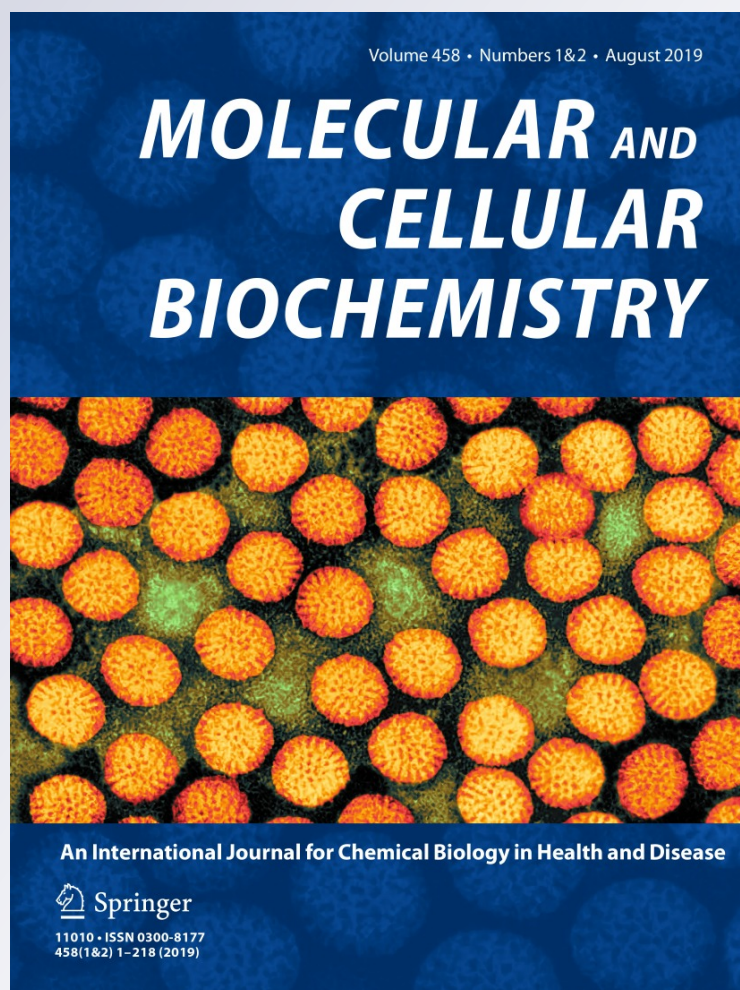
*Chronic effects of platinum(IV) complex
and its diamine ligand on rat heart
function: comparison with cisplatin*

**Jelena Smigic, Tibor Sabo, Aleksandra
Vranic, Vladimir Zivkovic, Ivan
Srejovic, Tamara Nikolic Turnic, Isidora
Milosavljevic, et al.**

Molecular and Cellular Biochemistry
An International Journal for Chemical
Biology in Health and Disease

ISSN 0300-8177
Volume 458
Combined 1-2


Mol Cell Biochem (2019) 458:89-98
DOI 10.1007/s11010-019-03533-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Chronic effects of platinum(IV) complex and its diamine ligand on rat heart function: comparison with cisplatin

Jelena Smigic¹ · Tibor Sabo² · Aleksandra Vranic³ · Vladimir Zivkovic¹ · Ivan Srejovic¹ · Tamara Nikolic Turnic³ · Isidora Milosavljevic³ · Jelena Poljarevic² · Milos Krivokapic⁴ · Sergey Bolevich⁵ · Vladimir Lj. Jakovljevic^{1,5} 

Received: 24 December 2018 / Accepted: 10 April 2019 / Published online: 15 April 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The aim of the present study was to compare the cardiodynamic parameters in the isolated rat heart in animals chronically treated with cisplatin, platinum(IV) complex and its diamine ligand. Sixty *Wistar albino* rats (8 weeks old) were divided into five groups: three experimental and two control groups. Animals in all groups were treated with a dose of 4 mg/kg body weight once a week for 4 weeks with different substances; experimental groups received cisplatin, ligand and octahedral platinum(IV) complex, and control groups received saline and dimethyl sulfoxide. After sacrificing the animals, hearts were isolated and perfused according to the Langendorff technique at gradually increased coronary perfusion pressures (40–120 cmH₂O). The following parameters of cardiac function were continuously recorded: maximum and minimum rate of change of pressure in the left ventricle, systolic and diastolic left ventricular pressure, heart rate and coronary flow. The results showed statistically significant differences between all experimental groups in maximum and minimum rate of pressure development as well as in systolic pressure of the left ventricle, whereas cisplatin, ligand and the platinum(IV) complex had effects on heart contractility without significant influences on coronary circulation. The findings of the present study could be important for a better understanding of anticancer drug cardiac side effects. Our results indicate that compared to cisplatin as a “gold standard”, novel platinum complexes and ligands do not possess fewer negative effects on the heart, indicating insufficient safety for their usage in terms of affecting cardiac function, a result that can be of great interest for further investigations.

Keywords Cisplatin · Ligand · Platinum(IV) complex · Rat · Cardiodynamics

Introduction

In general, platinum-based drugs are the most commonly used drugs in the treatment of various types of cancer [1]. One of the most frequently used complexes for chemotherapy is cisplatin (cis-diamminedichloridoplatinum(II)). It can be used either in different combinations with radiotherapy or other cytotoxic drugs or as a monotherapy [2]. Cisplatin has a wide spectrum of indications in the therapy of different cancer types, such as ovarian, cervical, bladder and testicular cancer. It can also be used in the treatment of head and neck cancers, respiratory system cancers and solid tumours resistant to other treatment regimens [1–3]. The cytotoxic effect of cisplatin can result from different interactions with DNA molecules. These interactions consequently lead to DNA damage followed by different pathological conditions, such as mitochondrial dysfunction, oxidative stress, DNA replication inhibition and apoptosis of tumour cells [4–6]. In addition, platinum (Pt) has other

✉ Vladimir Lj. Jakovljevic
drvladakgbg@yahoo.com

¹ Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia

² Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, Belgrade 11000, Serbia

³ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Kragujevac 34000, Serbia

⁴ Agency for Medicines and Medical Devices of Montenegro, Bulevar Ivana Crnojevića 64a, 81000 Podgorica, Montenegro

⁵ Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Trubetskaya street 8, str. 2, 119991 Moscow, Russia

targets, such as RNA, peptides, enzymes included in replication and proteins with nucleophilic sites [7, 8].

Previous data have shown that cisplatin covalently binds 5–10% of DNA [7], while 75–85% of platinum drugs interact with non-DNA molecules such as glutathione [5]. Despite its wide use and high activity, treatment with cisplatin is limited [9]. This is due to a number of adverse effects, such as neuro-, nephro- and ototoxicity. Furthermore, there are other limitations, such as resistance, mutagenic and secondary carcinogenic activities [9–11]. Earlier studies have also indicated that cisplatin therapy is usually associated with cardiotoxicity [12]. There are different manifestations of this adverse effect, such as myocarditis, disturbance of heart rhythm and heart failure [13]. Although there is a good understanding of the antitumour effects of cisplatin, the mechanisms involved in the toxic side effects of cisplatin remain unknown [14]. There is some evidence that oxidative stress can be included in cisplatin-induced toxicity due to increased lipid peroxidation and generation of reactive oxygen species, such as superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radical (OH^-) [15], and to decreased plasma concentrations of various antioxidants [16] after drug administration. This can lead to failure of the antioxidative defence mechanism against free radical-mediated organ damage secondary malignancies in normal tissues [15].

On the other hand, there has been an increase in the interest of platinum complexes in recent years, because the different binding modes and increased affinity of the platinum complex for the DNA molecule can lead to a reduction of side effects in comparison to cisplatin [17]. In the last 30 years, many platinum complexes were synthesized in an attempt to overcome all of the previously mentioned limitations of cisplatin [18]. With few exceptions, platinum(IV) complexes, designed as anticancer prodrugs, are based on the octahedral $[PtA_2L_2X_2]$ motif with different axial ligands [19]. The main reason for the anticancer activity of Pt(IV) complexes could be the incorporation of their organic ligands into the ethylenediamine group, which has a positive effect on cytotoxicity. Indeed, it has been shown that organic ligands alone significantly increased in vitro toxicity towards melanoma, glioma and fibrosarcoma cell lines, but the mechanisms of their cytotoxic activity are still not fully known [4].

In our experimental model of an isolated, perfused rat heart, we estimated cardiac functional parameters and coronary flow following the perfusion of cisplatin (the reference compound), the ethylenediamine moiety ligand and a Pt(IV) complex containing the ethylenediamine moiety. The aim of the present study was to compare the cardiodynamic parameters in the isolated rat heart in animals chronically treated with cisplatin, the Pt(IV) complex and the ligand.

Materials and methods

Experimental protocol

This was a chronic experimental study conducted on male *Wistar albino* rats (body weight 250 ± 50 g) aged 8 weeks. The animals were divided into five groups (12 animals per group), two control and three experimental groups, treated intraperitoneally once a week for 4 weeks with the following compounds [20]:

1. Saline (4 ml/kg body weight)—control for cisplatin;
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (4 ml/kg body weight)—control for the ligand and the Pt(IV) complex;
3. Cisplatin (the “golden standard”)—(4 mg/kg body weight);
4. O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride—ligand (4 mg/kg body weight);
5. Octahedral Pt(IV) complex with O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride $[PtCl_4\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}]$ —Pt(IV) complex (4 mg/kg body weight).

Ethical approval

The study was performed in the Laboratory for the Cardiovascular Physiology of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. It was approved by the Ethical Committee of the Faculty and performed according to the Faculty's rules for the welfare of laboratory animals, which are in consent with Good laboratory practice and European Council Directive (86/609/EEC).

Isolated rat heart preparation

After the 4 weeks of the experimental protocol, the animals were anaesthetized with ketamine (10 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and then euthanized via cervical dislocation (Schedule 1 of the Animals/Scientific Procedures, Act 1986, UK). Following a quick thoracotomy and rapid cardiac arrest by superfusion with ice-cold isotonic saline, the hearts were promptly excised and attached to a Langendorff apparatus (Langendorff apparatus, Experimetria Ltd, 1062 Budapest, Hungary) via aortic cannulation and then perfused with Krebs–Henseleit solution to provide retrograde perfusion under gradually increasing coronary perfusion pressure (CPP) (40 cmH_2O to 120 cmH_2O). Krebs–Henseleit buffer was used for retrograde perfusion (in mmol/l: NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 2.5,

MgSO₄ × 7H₂O 1.7, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11 and pyruvate 2). The buffer was balanced with 95% O₂ and 5% CO₂, with a pH value of 7.4 and a temperature of 37 °C.

Perfusion of the isolated rat heart

Following the establishment of heart perfusion, the preparations were stabilized within 30 min with a basal CPP of 70 cmH₂O. Following the stabilization period, the perfusion pressure was reduced to 50 and 40 cmH₂O and then gradually increased to 60, 80, 100 and 120 cmH₂O to establish coronary autoregulation. Testing started immediately after the control experiment to avoid unwanted time-dependent consequences. After placing the sensor (transducer BS4 73-0184, Experimetria Ltd., Budapest, Hungary) into the left ventricle, the following cardiodynamic parameters were continuously registered: maximum and minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max, dp/dt min), systolic and diastolic left ventricle pressure (SLVP and DLVP, respectively), heart rate (HR) and coronary flow (CF) on each of predetermined values of perfusion pressure (40, 60, 80, 100 and 120 cmH₂O). CF was measured by flowmetry.

Substances

All substances necessary for the preparation of Krebs–Henseleit buffer as well as cisplatin were purchased from the company Sigma-Aldrich GmbH, Germany. For the treatment of the control group and the dissolution of cisplatin, saline (0.9% NaCl, Hemofarhospital Logica) was used. The Pt(IV) complex and ligand were obtained from the Faculty of Chemistry, University of Belgrade.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean value (X) ± standard deviation (SD). The Wilcoxon signed rank test and the Mann–Whitney U test were used in the statistical analysis. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant, and *p* values less than 0.01 were considered highly statistically significant. The Wilcoxon signed rank test was used to analyse the difference between related samples, while the Mann–Whitney U test was used to analyse the difference between cardiodynamic parameters in different groups. Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 for Windows.

Results

Maximum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt max)

The maximum rate of pressure development was significantly different between all compared groups at all CPPs except between groups treated chronically with ligand and Pt(IV) complex at CPP 40 cmH₂O. The CPP value linearly increased from 40 to 120 cmH₂O, a trend that was present in all compared groups. The greatest depression of contractility was caused by the ligand, while contractility was least affected by cisplatin (Fig. 4a). Comparison of experimental groups with their controls (DMSO) showed depression of this parameter after chronic treatment with the ligand and Pt(IV) complex (Figs. 2a, 3a). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1a).

Minimum rate of pressure development in the left ventricle (dp/dt min)

The minimum rate of pressure development in the left ventricle was highly significantly different (*p* < 0.01) at all CPPs between groups that were chronically treated with cisplatin and ligand. Comparing results between groups treated with cisplatin and Pt(IV) complex, CPP values were significantly different in the group treated with cisplatin at 60–100 cmH₂O. CPP values were significantly different in the group treated with the Pt(IV) complex compared to the ligand at 60–120 cmH₂O. The CPP value linearly increased from 40 to 120 cmH₂O, a trend that was present in all compared groups. The greatest depression of contractility measured as dp/dt min was caused by the ligand, while contractility was least affected by cisplatin (Fig. 4b). Comparison of experimental groups with their controls (DMSO) showed depression of this parameter after chronic treatment with the ligand and Pt(IV) complex (Figs. 2b, 3b). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1b).

Systolic pressure of the left ventricle (SLVP)

The systolic pressure of the left ventricle was the highest after chronic administration of cisplatin. Lower values were observed in the Pt(IV) complex group, and the lowest values were observed after chronic ligand administration. SLVP was significantly higher in cisplatin compared to the ligand group at all CPPs. Comparing the chronic administration of cisplatin to the chronic administration of the Pt(IV) complex, the same trend was observed in previous

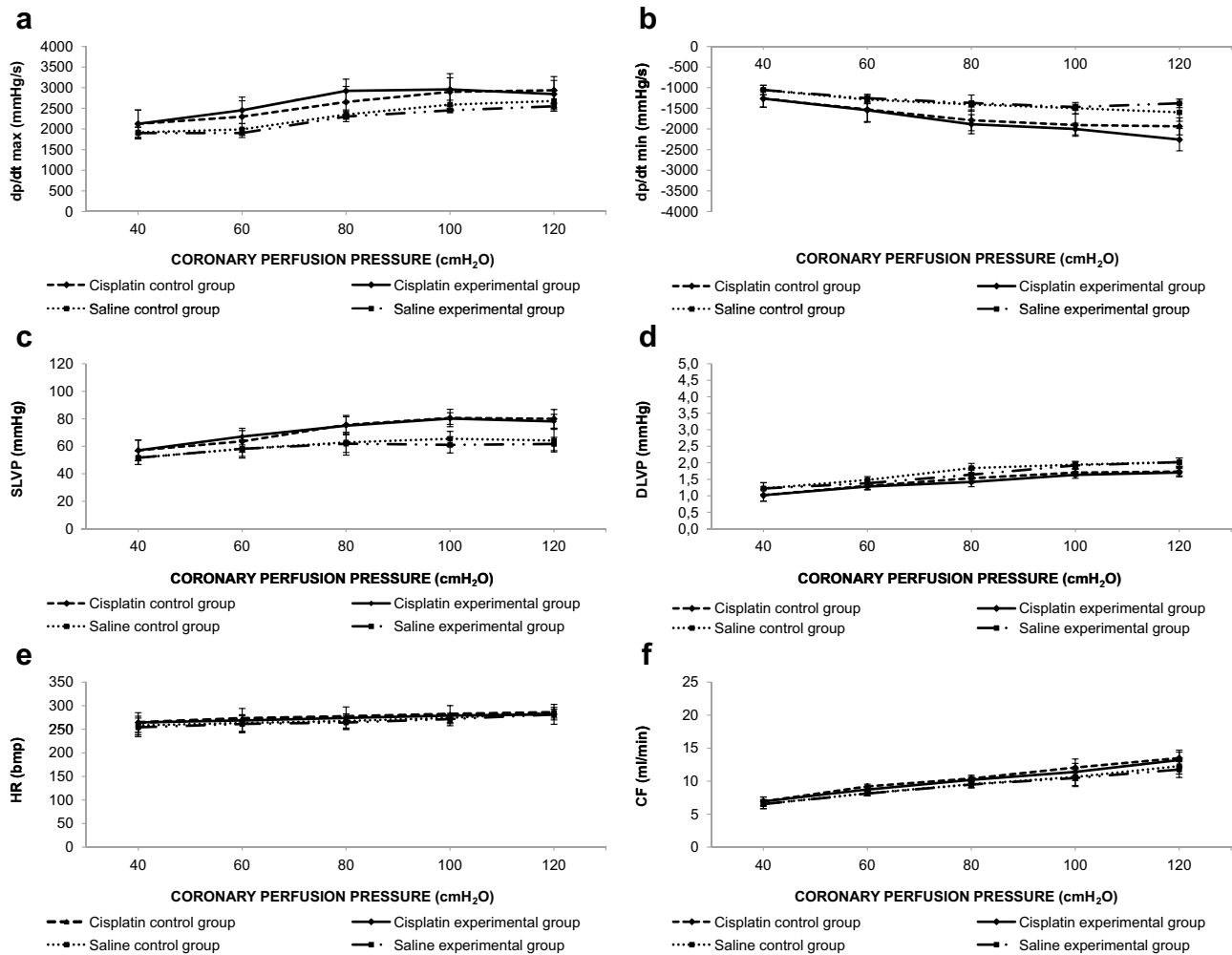


Fig. 1 Comparison between the saline and cisplatin groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt

min). **c** Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d** Diastolic left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coronary flow (CF). Data are presented as the mean \pm SD

groups. Cisplatin increased SLVP at CPP values from 40 to 100 cmH₂O compared to the Pt(IV) complex. The Pt(IV) complex increased SLVP compared to the ligand group at CPP values from 60 to 100 cmH₂O (Fig. 4c). Comparison of experimental groups with their controls (DMSO) showed depression of this parameter after chronic treatment with ligand and Pt(IV) complex (Figs. 2c, 3c). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1c).

Diastolic pressure of the left ventricle (DLVP)

Compared to prior analysed results, diastolic pressure of the left ventricle does not have the same trend as previously described cardiodynamic parameters. The highest DLVP value was observed after chronic administration of the Pt(IV) complex. Lower values were observed in the ligand

group, and the lowest values were observed after chronic cisplatin administration. The diastolic pressure of the left ventricle was significantly higher after chronic ligand administration compared to the cisplatin group at CPP 40 cmH₂O. Chronic administration of the Pt(IV) complex increased DLVP values compared to cisplatin at all CPPs but was only statistically significant at 60 and 100 cmH₂O (Fig. 4d). There was no statistical significance either in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1d) or after chronic treatment with the ligand and Pt(IV) complex compared to their controls (DMSO) (Figs. 2d, 3d).

Heart rate (HR)

In addition to DLVP, the same trend has been observed after chronic administration of cisplatin, Pt(IV) complex and ligand on the heart rate. The highest heart rate value was

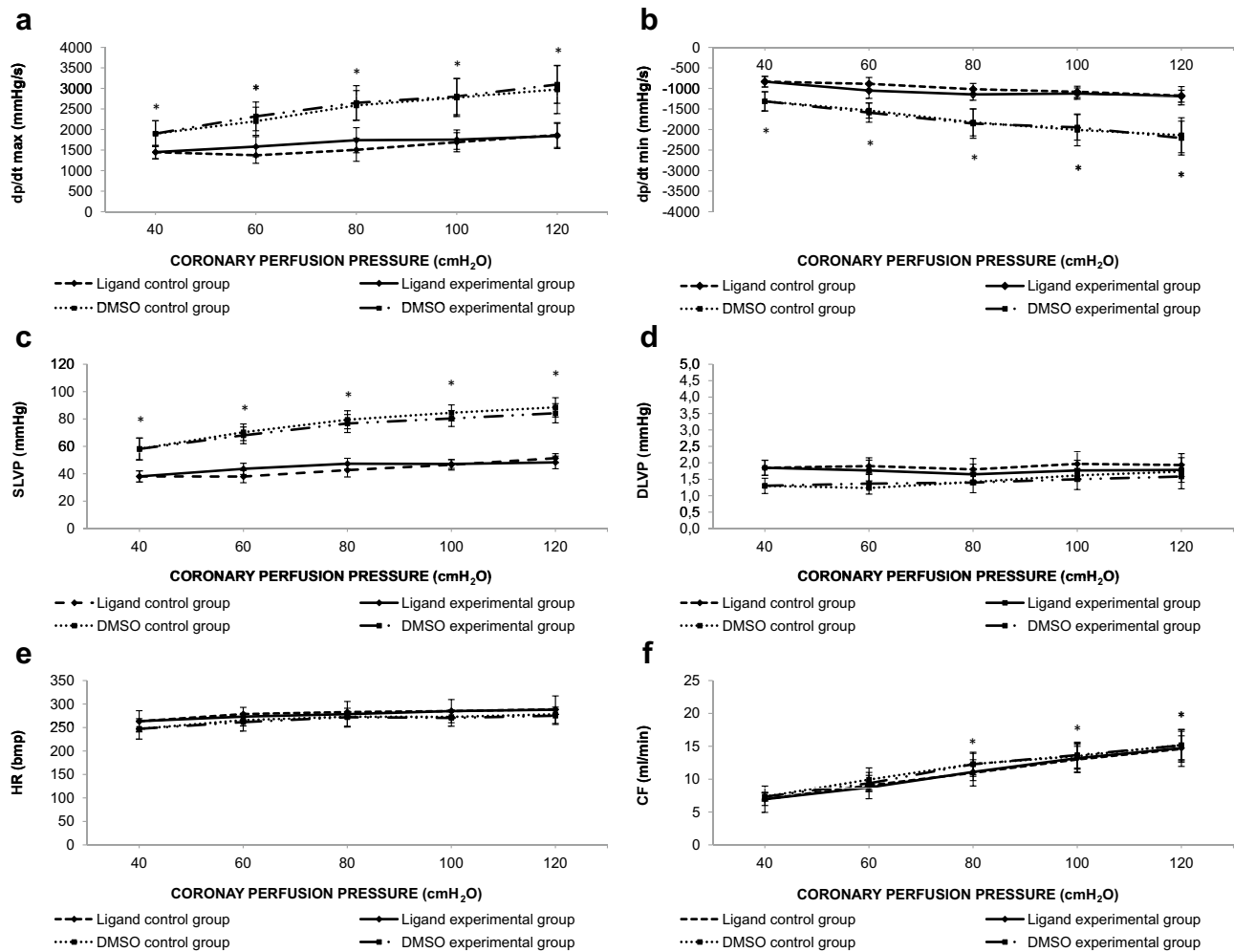


Fig. 2 Comparison between DMSO and ligand groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt min). **c**

Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d** Diastolic left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coronary flow (CF). Data are presented as the mean \pm SD. *statistical significance ($p < 0.05$)

observed after chronic administration of the Pt(IV) complex. Lower values were observed in the group chronically treated with ligand, and the lowest heart rate was observed after chronic cisplatin administration. The only significant difference was in comparing the cisplatin group compared to the Pt(IV) complex, whereby the Pt(IV) complex had a significantly greater the heart rate at 120 cmH₂O CPP (Fig. 4e). Cisplatin and ligand did not show any statistical significance compared to their controls (saline and DMSO, respectively) (Figs. 1e, 2e), while comparison of the Pt(IV) complex with its control (DMSO) showed higher values in the experimental group (Fig. 3e).

Coronary flow (CF)

The highest coronary flow value was observed after chronic administration of the Pt(IV) complex. Lower values were observed in the ligand group, and the lowest values were

observed after chronic cisplatin administration. All administered compounds had the same influence on coronary flow, DLVP and heart rate but were not significantly different (Fig. 4f). Chronic treatment with ligand decreased CF (Fig. 2f), while Pt(IV) complex increased the values of this parameter (Fig. 3f) compared with their controls (DMSO). There was no statistical significance in the cisplatin group compared to the control (saline) (Fig. 1f).

There is no statistical significance between saline and DMSO (data not presented).

Discussion

The present study aimed to examine the effects of different antineoplastic compounds—cisplatin, ligand and Pt(IV) complex—on cardiodynamic parameters and to

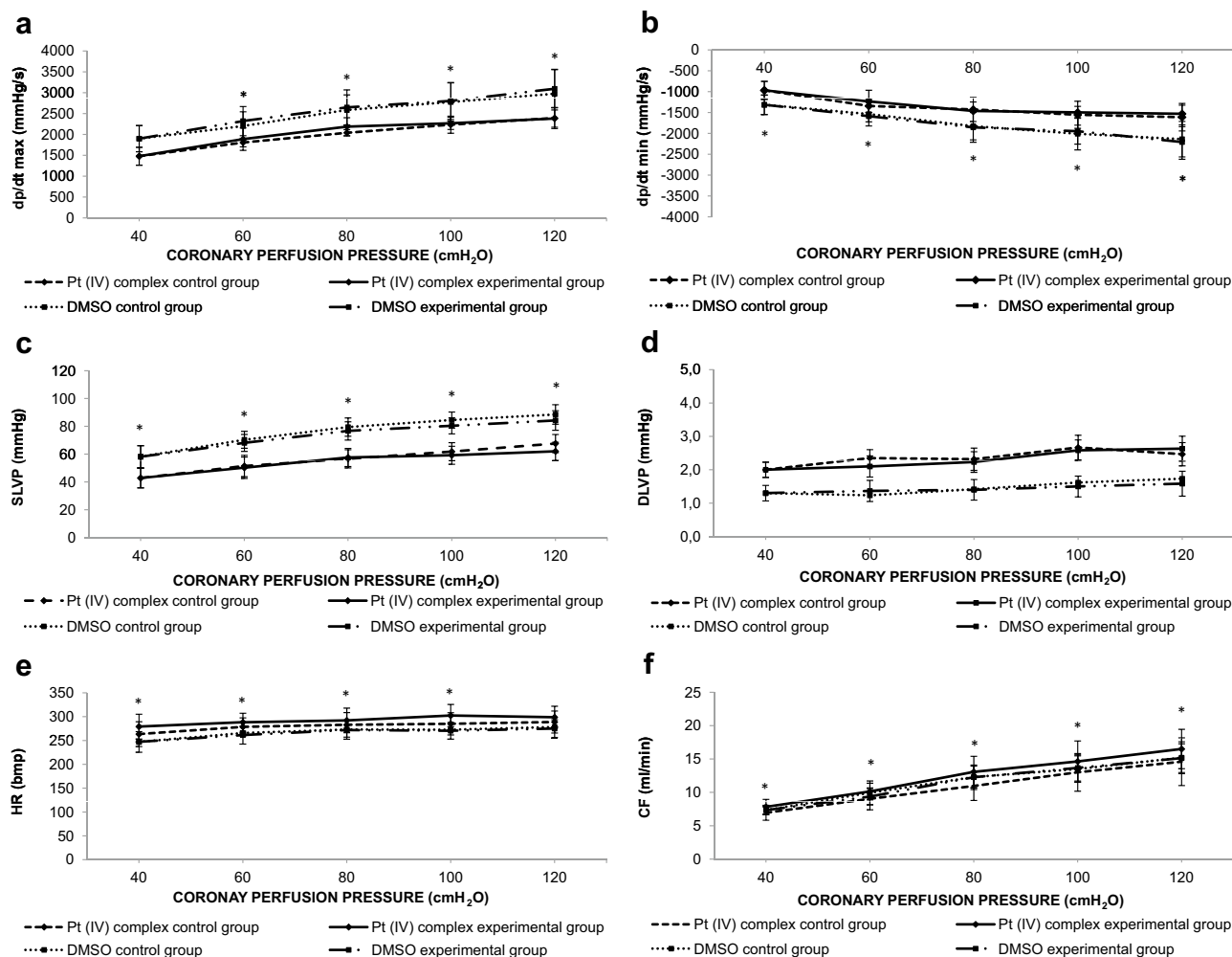


Fig. 3 Comparison between DMSO and Pt(IV) complex groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt min). **c** Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d**

left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coronary flow (CF). Data are presented as the mean ± SD. *statistical significance (p < 0.05)

compare their influence on heart contractility and coronary circulation.

The cardiotoxic effects of neoplastic drugs can manifest in three forms: acute, subacute and chronic. Abnormalities in heart rhythm and electrocardiographic QT-interval changes are the main manifestations of acute or subacute cardiotoxicity (CTX) that developed from the beginning of therapy to 2 weeks after the end of therapy. The third form, chronic CTX, has two subtypes: early, within 1 year after termination of chemotherapy, or late, more than 1 year after chemotherapy. Chronic CTX manifests as asymptomatic systolic and/or diastolic LV dysfunction, which could lead to dilated cardiomyopathy [21].

According to previous studies, cisplatin has a wide spectrum of antineoplastic activity, but cardiotoxicity is a limiting factor [21] presenting different abnormalities, such as

acute myocardial infarction, pressure changes, heart rhythm disorders and an increased risk of thrombotic events [22–24].

In contrast to the well-known mechanisms of antitumour activity, the mechanisms involved in cisplatin cardiotoxicity remain unclear [25]. Cisplatin CTX can be induced directly through toxic effects on cardiac myocytes followed by extracellular matrix and coronary endothelium damage [26] or indirectly from overproduction of reactive oxygen species and increased oxidative stress with morphological and functional changes of tissue [20]. Moreover, cisplatin can enhance platelet aggregation and thromboxane formation and activate arachidonic acid pathways that can lead to thrombotic events in patients treated with this drug [27].

The aim of cisplatin analogue development was to obtain drugs with increased efficacy and decreased toxicity [28]. Accordingly, new platinum(IV) complexes showed positive

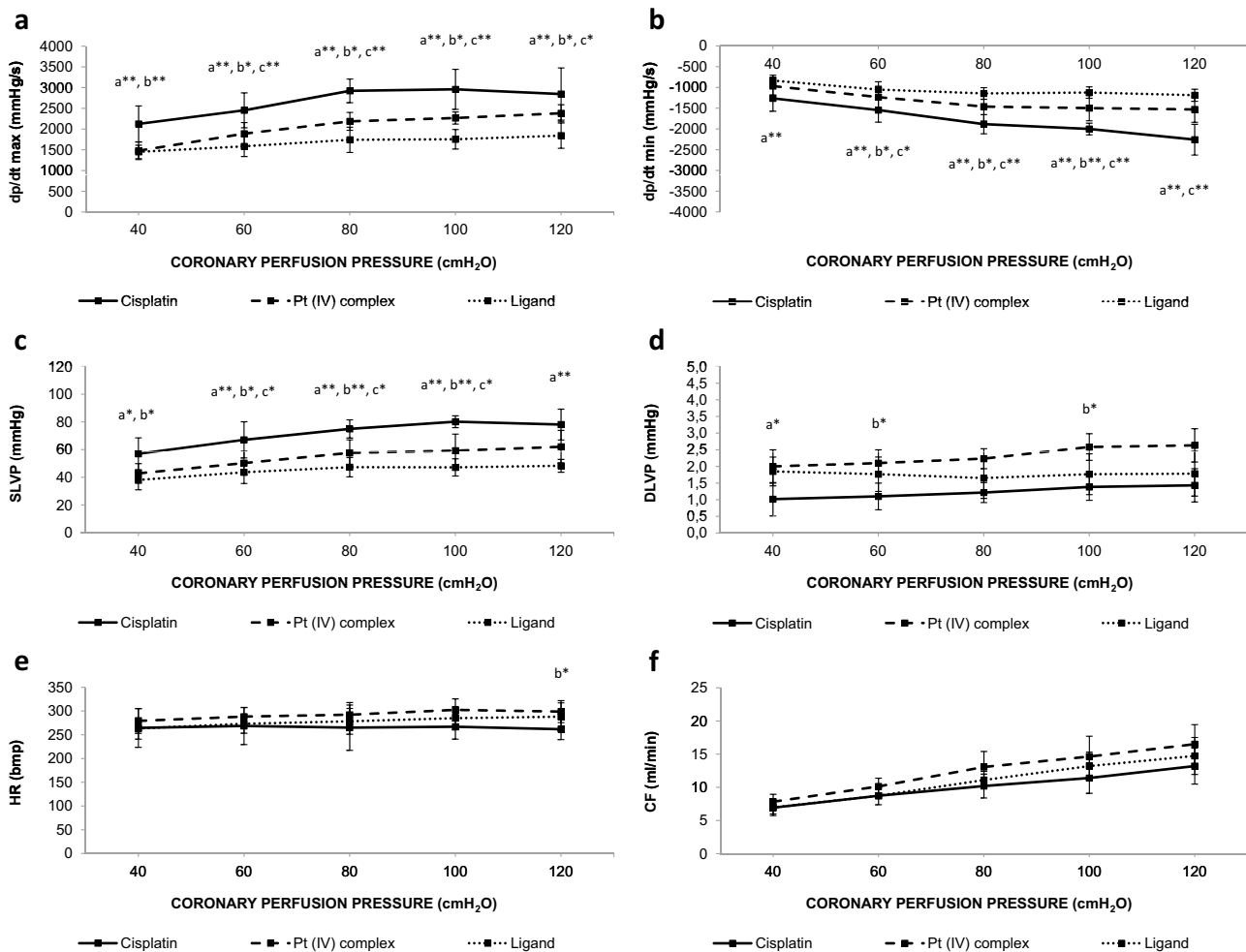


Fig. 4 Comparison between cisplatin, ligand and Pt(IV) complex groups. **a** Maximum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt max). **b** Minimum rate of development pressure in the left ventricle (dp/dt min). **c** Systolic left ventricle pressure (SLVP). **d** Diastolic left ventricle pressure (DLVP). **e** Heart rate (HR). **f** Coro-

nary flow (CF). Data are presented as the mean \pm SD. *statistical significance ($p < 0.05$); **statistical significance ($p < 0.01$). **a** cisplatin compared to ligand; **b** cisplatin compared to Pt(IV) complex; **c** ligand compared to Pt(IV) complex

results regarding antitumour activity and cardiotoxicity [29, 30].

Orally available platinum(IV) complexes with octahedral structures are more resistant to hydrolysis, and they bind readily to DNA compared to platinum(II) compounds, which leads to fewer side effects. Moreover, there is less possibility of gastrointestinal tract degradation [28]. In our study, we used the octahedral platinum(IV) complex, which showed reduced heart contractility compared to cisplatin, but these values were still higher compared to the ligand group (Fig. 4a, b). Additionally, heart rate had the highest values in the Pt(IV) complex group compared to the other groups but was only statistically higher relative to cisplatin at 120 cmH₂O (Fig. 4e). In accordance with these results, previous in vitro studies found that Pt(IV) complexes with edda-type ligands are generally less efficient than cisplatin [31]. In

contrast to our results, other studies on different structures of Pt(IV) complexes with esterified edda-type ligands indicate that anticancer activity is increased relative to cisplatin. Namely, this can be the result of rapid necrotic cell death in some cancer cell lines, contrary to the slower generation of apoptosis induced by cisplatin [32]. Compared to these data, our Pt(IV) complex did not improve heart contractility (Fig. 4a, b), but coronary circulation increased linearly in all groups from 40 to 120 cmH₂O. In the cisplatin group, the values were the lowest, and the Pt(IV) complex group had the highest values, which is in accordance with previous results [20].

Furthermore, there is a lack of data on the effects of Pt(IV) complexes on myocardium and coronary circulation. A previous study indicated that platinum(IV) complexes containing the ethylenediamine moiety showed cytotoxic

effects [33]. These results somewhat correlate with ours because we also used the ethylenediamine motif, which showed depression in heart contractility relative to cisplatin (Fig. 4a, b). Despite these results, another study showed that cytotoxicity can be decreased due to ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionate (eddp) substitution with ethylenediamine-*N,N'*-diacetate (edda) [30]. In accordance with this, previous findings showed a less negative impact of novel Pt(IV) analogues containing ethylenediamine and the 1,2-diaminocyclohexane moiety (compared to cisplatin) [34]. Considering that, in the present study, we used the ethylenediamine-*N,N'*-di-3-propionate motif, in future studies, we can consider the use of ethylenediamine-*N,N'*-diacetate, which, as previously mentioned, can indicate better cardiovascular performance [30].

Another animal study showed that, as a non-anthracycline agent, cisplatin might lead to different pathological conditions, such as LV dysfunction and cardiomyocyte contraction depression. This can be the result of abnormalities, such as changes in mitochondrial structure, which can lead to the stress response of the endoplasmic reticulum and subsequently to apoptosis [14]. Nonetheless, it can induce acute injuries such as ischaemia, which can occur within hours or days after the start of treatment [21, 35], and it can be associated with a CTX risk throughout the life of the patient [36]. In our study, cisplatin had the least negative effects on contractility, but it induced depression of DLVP (Fig. 4d) and heart rate (Fig. 4e) compared to the two other administered compounds. The higher level of contractility depression caused by the ligand and Pt(IV) complex (compared to cisplatin) found in the present study can be a consequence of ligand-induced, mitochondria-derived superoxide hyperproduction and increased oxidative stress [37], which leads to cardiomyocyte damage [38].

In general, the results regarding the comparison of all three compounds with their controls indicate that, contrary to cisplatin, which had not changed cardiac function compared to its control (saline), both the ligand and the Pt(IV) complex caused cardio-depressive effects relative to their controls (DMSO). These findings are in accordance with the other results in our study, which highlight the more prominent negative effects of the ligand and the Pt(IV) complex compared to cisplatin. In addition to cisplatin, the influence of the ligand and the Pt(IV) complex was demonstrated on heart contractility without significant influence on coronary circulation.

Conclusion

The findings of the present study could be important for a better understanding of anticancer drug cardiac side effects. Our results indicate that compared to the “gold standard”,

the novel platinum complex and the ligand do not possess fewer negative effects on the heart, indicating insufficient safety for its usage in terms of affecting cardiac function. The findings of this study may be of great interest for further investigations concerning the effects of novel platinum compounds on the heart.

Acknowledgements This work was supported by the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Junior Project No. 09/2011).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest None of the authors of the present study has any actual or potential conflicts of interest to disclose, including financial, personal, or other relationships with specific persons or organizations.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Research procedures were carried out in accordance with European Directive for the Welfare of Laboratory Animals (86/609/EEC) and Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, number: 01-4583.

References

- Ahmad S (2010) Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 7:543–566. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200800340>
- Lazarević T, Rilak A, Bugarčić ŽD (2017) Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem* 142:8–31. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.007>
- El-Awady ESE, Moustafa YM, Abo-Elmatty DM, Radwan A (2011) Cisplatin-induced cardiotoxicity: mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur J Pharmacol* 650:335–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.085>
- Misirlic Dencic S, Poljarevic J, Vilimanovich U, Bogdanovic A, Isakovic AJ, Kravic Stevovic T, Dulovic M, Zogovic N, Isakovic AM, Grguric-Sipka S, Bumbasirevic V, Sabo T, Trajkovic V, Markovic I (2012) Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem Res Toxicol* 25:931–939. <https://doi.org/10.1021/tx3000329>
- Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM (2003) Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* 10:257–266. <https://doi.org/10.2174/0929867033368484>
- Jung Y, Lippard SJ (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* 107:1387–1407. <https://doi.org/10.1021/cr068207j>
- Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM (2003) Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 103:645–662. <https://doi.org/10.1021/cr020010d>
- Timerbaev AR, Hartinger CG, Alekseenko SS, Keppler BK (2006) Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern

- analytical methodology. *Chem Rev* 106:2224–2248. <https://doi.org/10.1021/cr040704h>
9. Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307–320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
 10. Wang X (2010) Fresh platinum complexes with promising anti-tumor activity. *Anticancer Agents Med Chem* 10:396–411. <https://doi.org/10.2174/1871520611009050396>
 11. Pasetto LM, D'Andrea MR, Brandes AA, Rossi E, Monfardini S (2006) The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol* 60:59–75. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.02.003>
 12. Pai VB, Nahata MC (2000) Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 22:263–302. <https://doi.org/10.2165/00002018-200022040-00002>
 13. Al-Majed AA, Sayed-Ahmed MM, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Shabanah OA (2006) Propionyl-L-carnitine prevents the progression of cisplatin-induced cardiomyopathy in a carnitine-depleted rat model. *Pharmacol Res* 53:278–286. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.12.005>
 14. Ma H, Jones KR, Guo R, Xu P, Shen Y, Ren J (2010) Cisplatin compromises myocardial contractile function and mitochondrial ultrastructure: role of endoplasmic reticulum stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:460–465. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05323.x>
 15. Wozniak K, Czechowska A, Blasiak J (2004) Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chem Biol Interact* 147:309–318. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.03.001>
 16. Weijl NI, Weijl NI, Hopman GD, Wipkink-Bakker A, Lentjes EG, Berger HM, Cleton FJ, Osanto S (1998) Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. *Ann Oncol* 9:1331–1337. <https://doi.org/10.1023/A:1008407014084>
 17. Wang XY, Guo ZJ (2008) Towards the rational design of platinum(II) and gold(III) complexes as antitumor agents. *Dalton Trans* 28:1521–1532. <https://doi.org/10.1039/b715903j>
 18. Montaña ÁM, Batalla C (2009) The rational design of anticancer platinum complexes: the importance of the structure-activity relationship. *Curr Med Chem* 16:2235–2260. <https://doi.org/10.2174/092986709788453087>
 19. Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK (2003) Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des* 9:2078–2089. <https://doi.org/10.2174/1381612033454180>
 20. Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, Srejsovic I, Zivkovic V, Tatalovic N, Orescanin-Dusic Z, Mitrovic S, Ilic M, Jakovljevic V (2016) The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett* 242:34–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.028>
 21. Madeddu C, Deidda M, Piras A, Cadeddu C, Demurtas L, Puzoni M, Piscopo G, Scartozzi M, Mercurio G (2016) Pathophysiology of cardiotoxicity induced by nonanthracycline chemotherapy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 17(Suppl 1):S12–S18. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000376>
 22. Bano N, Najam R, Qazi F (2013) Adverse cardiac manifestations of cisplatin—a review. *Int J Pharm Sci Rev Res* 18:80–85
 23. Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M (2008) Biochemical markers for prediction of chemotherapy-induced cardiotoxicity: systematic review of the literature and recommendations for use. *Am J Clin Pathol* 130:688–695. <https://doi.org/10.1309/AJCPB66LRIIVMQDR>
 24. Ryberg M (2012) Recent advances in cardiotoxicity of anticancer therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 32:555–559. https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2012.32.555
 25. Smigic J, Stojic I, Zivkovic V, Srejsovic I, Nikolic T, Jeremic J, Sabo T, Jakovljevic V (2017) The effects of chronic administration of cisplatin on oxidative stress in the isolated rat heart. *SJECR*. <https://doi.org/10.1515/SJECR-2017-0003>
 26. Altena R, Hummel YM, Nuver J, Smit AJ, Lefrandt JD, de Boer RA, Voors AA, van den Berg MP, de Vries EG, Boezen HM, Gietema JA (2011) Longitudinal changes in cardiac function after cisplatin-based chemotherapy for testicular cancer. *Ann Oncol* 22:2286–2293. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr408>
 27. Schimmel KJ, Richel DJ, Van den Brink RB, Guchelaar HJ (2004) Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev* 30:181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.003>
 28. Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK (2003) Tumor—inhibiting platinum complexes—state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:1–53. <https://doi.org/10.1007/s10254-002-0001-x>
 29. Shi Y, Liu SA, Kerwood DJ, Goodisman J, Dabrowiak JC (2012) Pt(IV) complexes as prodrugs for cisplatin. *J Inorg Biochem* 107:6–14. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.10.012>
 30. Sabo TJ, Kaluderović GN, Poleti D, Karanović L, Boccarelli A, Cannito F, Natile G (2004) Cytotoxicity of some platinum(IV) complexes with ethylenediamine-N, N'-di-3-propionato ligand. *J Inorg Biochem* 98:1378–1384. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.04.023>
 31. Kaluderović GN, Đinović VM, Juranić ZD, Stanojković TP, Sabo TJ (2005) Activity of some platinum(II/IV) complexes with O, O-n-butyl- and O, O-n-pentyl-ethylenediamine-N, N'-di-3-propanoate and halogeno ligands against HeLa and K562 cell lines and human PBMC. *J Inorg Biochem* 99:488–496. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.10.025>
 32. Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ (2010) Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N, N'-diacetate-type ligands. *Chem Med Chem* 5:881–889. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000058>
 33. Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR, Nolan KB (2001) Synthesis and antitumor activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of [PtL4Cl2]H2O where L4 is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem* 83(2–3):91–100. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(00\)00190-2](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(00)00190-2)
 34. Misić MM, Jakovljević VL, Bugarcic ZD, Zivkovic VI, Srejsovic IM, Barudzic NS, Djuric DM, Novokmet SS (2015) Platinum complexes-induced cardiotoxicity of isolated, perfused rat heart: comparison of Pt(II) and Pt(IV) analogues versus cisplatin. *Cardiovasc Toxicol* 15(3):261–268. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9293-8>
 35. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G (2008) Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol* 21:978–989. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9293-8>
 36. Carver JR, Carver JR, Shapiro CL, Ng A, Jacobs L, Schwartz C, Virgo KS, Hagerty KL, Somerfield MR, Vaughn DJ (2007) ASCO Cancer Survivorship Expert Panel. American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *J Clin Oncol* 25:3991–4008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.10.9777>
 37. Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isakovic AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S (2017) Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: comparison of the representative

- novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. *Chem Biol Drug Des* 90:262–271. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12945>
38. Hussein A, Ahmed AA, Shouman SA, Sharawy S (2012) Ameliorating effect of DL- α -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. *Drug Discov Ther* 6:147–156. <https://doi.org/10.5582/ddt.2012.v6.3.147>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REDOX STATUS IN WOMEN WITH RHEUMATOID ARTHRITISAleksandra Vranic¹, Aleksandra Antovic², Nevena Draginic³, Marijana Andjic¹, Marko Ravic¹, Vladimir Jakovljevic^{3,4}, Mirjana Veselinovic⁵¹Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia²Karolinska Institutet, Department of Medicine, Solna, Rheumatology Unit and Academic Specialist Center, Center for Rheumatology, Stockholm Health Services, Stockholm, Sweden³Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia⁴Department of Human Pathology, 1st Moscow State Medical University IM Sechenov, Moscow, Russia⁵Department of Internal medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia**REDOKS STATUS KOD ŽENA SA REUMATOIDNIM ARTRITISOM**Aleksandra Vranic¹, Aleksandra Antovic², Nevena Draginic³, Marijana Andjic¹, Marko Ravic¹, Vladimir Jakovljevic^{3,4}, Mirjana Veselinovic⁵¹Katedra za farmaciju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija²Karolinska Institut, Odsek medicina, Solna, Odeljenje za reumatologiju i Akademski specijalisticki centar, Centar za reumatologiju, Medicinski centar Stokholm, Stokholm, Svedska³Katedra za fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija⁴Odsek za humanu patologiju, Prvi Moskovski državni medicinski univerzitet I.M. Sechenov, Moskva, Rusija⁵Katedra za internu medicine, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, Srbija

Received / Priljen: 19. 10. 2018.

Accepted / Prihvaćen: 26. 10. 2018.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess oxidative status and to set baseline characteristics for female population with established rheumatoid arthritis. Total of 42 patients with rheumatoid arthritis and 48 age- and sex-matched controls were included in the study. Clinical examination was performed and assessed disease activity. Peripheral blood samples were used for all the assays. The markers of oxidative stress were assessed, including plasma levels of index of lipid peroxidation – thiobarbituric acid reactive substances, hydrogen peroxide, superoxide anion radical, nitrites and activity of superoxide dismutase, catalase and reduced glutathione levels as anti-oxidant parameters. In the patients group, levels of hydrogen peroxide and index of lipid peroxidation were higher than in controls. Patients with rheumatoid arthritis had decreased superoxide dismutase and catalase activity compared to healthy subjects. Interestingly, controls had higher levels of nitrites compared to patients. Patients showed a marked increase in reactive oxygen species formation and lipid peroxidation as well as decrease in the activity of antioxidant defense system leading to oxidative stress which may contribute to tissue and cartilage damage and hence to the chronicity of the disease.

Keywords: rheumatoid arthritis, oxidative stress, reactive oxygen species, women

SAŽETAK

Studija ima za cilj da proceni oksidacioni status i utvrdi osnovne karakteristike ženske populacije sa dijagnozom reumato. U istraživanje je uključeno 42 pacijenta sa reumatoidnim artritisom i 48 zdrava ispitanika iste starosti i pola. Urađen je klinički pregled i procenjena je aktivnost bolesti. Uzorci periferne krvi su korišćeni za sve testove. Određivani su markeri oksidacionog stresa, uključujući plazma koncentracije indeksa lipidne peroksidacije, vodonik peroksida, superoksid anjon radikala, nitrita kao i aktivnost superoksid dismutaze, katalaze i nivo redukovano glutationa kao antioksidacionih parametara. Kod pacijenata, nivoi vodonik peroksida i indeksa lipidne peroksidacije bili su veći nego u kontrolnoj grupi. Pacijenti sa reumatoidnim artritisom imali su smanjenu aktivnost superoksid dismutaze i katalaze u poređenju sa zdravim osobama. Interesantno, kontrole su imale veće vrednosti nitrita u poređenju sa pacijentima. Pacijenti sa reumatoidnim artritisom pokazali su značajno povećanje koncentracije reaktivnih kiseonичnih vrsta, kao i smanjenje aktivnosti antioksidacionog sistema, što dovodi do nastanka oksidacionog stresa koji može doprineti oštećenju tkiva i hrskavice, a time i hroničnom toku bolesti.

Cljučne reči: reumatoidni artritis, oksidacioni stres, reaktivne kiseonичne vrste, žene

**ABBREVIATIONS**

Anti-CCP – Anticyclic citrullinated polypeptide
aPTT – activated partial thromboplastin time
BMI – Body mass index
CRP – C-reactive protein
DAS28 – Disease activity score
ESR – Erythrocyte Sedimentation Rate

INR – International Normalised Ratio
LPO – lipid peroxidation
PT – prothrombin time
RA – Rheumatoid arthritis
RF – Rheumatoid factor
ROS – Reactive oxygen species



INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is systemic autoimmune disease manifested as erosive polyarthritis with chronic manner, intermittent acute inflammatory episodes and extra-articular manifestation (1). It consequently leads to progressive cartilage and joints damage as well as to disability (2) and represents a significant burden both for the individual and for society (3). RA affects almost 1% of the total population whereby it is characterized by a strong systemic inflammation with a shortened lifetime and increased mortality (4). Data suggests that the risk to develop this disease is 3:1 in favor of the female (5) with a significant higher disease activity in this population (6).

Oxidative stress and decreased antioxidant status are the hallmarks in patients of RA as observed in recent years. It is a dynamic phenomenon involved in the disease pathogenesis in a complex way. Oxidative stress represents an imbalance between pro-oxidants and antioxidants in the body in favor of reactive oxygen species (ROS) (7).

As a response to inflammatory conditions in RA an ROS overproduction is usually generated from endogenous source such as mitochondrial electron transport chain by the process of oxidative phosphorylation. Generally, oxygen species in RA have different origin and it can be produced by activated macrophages in the synovial membrane, by chondrocytes, and also through activated neutrophils in the synovial cavity (8). Reaction of ROS production is followed by upregulation of different enzymes such as NADPH oxidase, nitric oxide synthase as well xanthine oxidase (9). Thereafter, NADPH oxidase complex catalyses oxygen reduction to superoxide anion radicals. Unless the concentration of this ROS is not neutralized by superoxide dismutase it consequently leads to deadly combination with NO, synthesis of toxic peroxynitrite. Components of cartilage and extracellular matrix are damaged either directly or indirectly by superoxide anion along with other oxygen and nitrogen radicals by reducing the synthesis of matrix components such as collagen and proteoglycans (10). In addition, the H_2O_2 -dependent inhibition of proteoglycan synthesis contributes to cartilage destruction in RA through interfering with the repairing mechanisms of the proteolytic and oxidative damages (11).

Increased values of ROS are potentially harmful for different macromolecules and it may result in impairment of physiological processes and damage cell membranes, lipids, proteins and nucleic acids. This leads to fast protonation, -SH group's depletion, deamination of DNA bases and lipid peroxidation (12). Afterwards, lipid peroxidation has been implicated in pathogenesis of many diseases such as cancer, degenerative disease as well inflammatory disease. It can be measured as thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and it may play an important role (13). Increased lipid peroxidation has been reported in various biological samples of RA patients (14).

Body has developed an antioxidant defense system in order to prevent damaging effects of the pro-oxidants and to protect the cells from oxidative damage. Some common enzymes involved in the neutralization or elimination of ROS are superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) as well as glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST), thioredoxin reductase (TR) and heme oxygenase (10). Catalase and reduced glutathione have affinity to H_2O_2 . Affinity of CAT increases due to higher values of H_2O_2 (15) while SOD has major effect in superoxide anion radical neutralization (10).

RA is a condition with strong influence of both genetic and environmental factors. Accordingly, data available about this disease and the biochemical aspects in our population are very minimal, limited and non-compliant. Regarding, the aim of this study was to assess oxidative status and to set baseline characteristics for female population with established rheumatoid arthritis.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Forty two women with diagnosed rheumatoid arthritis referred to the outpatient of Internal Clinic, Department of Rheumatology were included in the study (mean age 54.8 ± 9.1). The mean disease duration was 12.8 ± 8.0 years and the mean value of DAS28 was 3.8 ± 1.1 at the moment of blood sampling. All patients were treated with the standard treatment protocol methotrexate (15-25mg per week) and prednisolone (≤ 10 mg per day). The diagnosis of rheumatoid arthritis was established according to Classification criteria for RA American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) 2010. Patients included in this study did not have history of diabetes, malignancy, inflammatory disease except rheumatoid arthritis, liver- or renal insufficiency, previous hospitalization due to cerebrovascular, cardiovascular disorders and venous thromboembolism. The patients treated with high doses of steroids (≥ 10 mg/day, including parenteral administration) and those treated with biologic therapy were excluded from the study. The number of swollen and tender joints of the selected patients was recorded with the help of a rheumatologist. Disease activity score (DAS28) was calculated using a universally accepted formula. Additionally, at the time of blood sampling patients were free of any medication known to influence oxidative balance.

Healthy controls

Forty eight age- and sex-matched subjects (mean age 54.1 ± 6.2) were included in the study as healthy controls and had a medical investigation to ensure absence of a history of diabetes, malignancy, inflammatory disease including rheumatoid arthritis, liver- or renal insufficiency. As well as in patients group, controls were free of any medication known to influence oxidative balance.



Written informed consent was obtained from all participants, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinical Center Kragujevac prior to the onset of the study. The investigation was conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki and principles of Good Clinical Practice (GCP).

Laboratory analysis

During blood sampling, blood was taken to perform laboratory analyzes. Biochemical and hematological analyzes (RE, anti-CCP, ESR, CRP, lipid status, leukocytes, leukocyte formula, fibrinogen, aPTT, PT, INR) for all research participants were obtained in the Central Laboratory of the Clinical Center Kragujevac.

Biochemical assays

Blood sampling was obtained in the same manner for all patients at the Internal Clinic, Department of Rheumatology, Clinical Center Kragujevac, Serbia. The examinations were performed in a quiet, air-conditioned, temperature-controlled room (22–24°C). Venous blood from all participants was collected between 8–10 a.m at least a 10-h fast in both patients and controls. Blood was collected in Vacutainer tubes containing 0.129 M sodium citrate (BD Vacutainer Blood Collection System) using 21-gauge polyethylene catheter for taking blood samples (BD Vacutainer needles). Blood was centrifuged to separate plasma and red blood cells (RBCs).

Redox status

Redox status was evaluated spectrophotometrically by measuring the levels of hydrogen peroxide, superoxide anion radical, nitrites and index of lipid peroxidation in plasma. Activities of corresponding antioxidative enzymes superoxide dismutase, catalase, and reduced glutathione were measured in erythrocytes in the same manner.

Index of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances)

The degree of lipid peroxidation in plasma was estimated by measuring of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using 0.4 ml 1% thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 NaOH mixed with 0.8 ml of plasma, incubated at 100 °C for 15 min and measured at 530 nm. Distilled water was used as a blank probe. TBA extract was obtained by combining 0.8 ml plasma and 0.4 ml TCA (trichloroacetic acid). Thereafter, samples were put on ice for 10 min, and centrifuged for 15 min at 6000 rpm (16).

Nitrite determination

Nitric oxide (NO) decomposes rapidly to form stable metabolite nitrite/nitrate products. The method for detection of the plasma nitrite levels is based on the Griess reaction. Nitrites (NO_2^-) were determined as an index of NO production with Griess reagent (forms

purple diazocomplex) (17). 0.1 ml 3 N PCA (perchloric acid), 0.4 ml 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), and 0.2 ml plasma were put on ice for 15 min, then centrifuged 15 min at 6000 rpm. After pouring off the supernatant, 220 μl K_2CO_3 was added. Nitrites were measured at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe.

Superoxide anion determination

The level of superoxide anion radical (O_2^-) was measured using Nitro Blue Tetrazolium (NBT) reaction in TRIS-buffer with plasma and read at 550 nm. Distilled water was used as a blank probe (18).

Hydrogen peroxide determination

Determination of hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration is based on oxidation of phenol red using hydrogen peroxide, in reaction catalyzed by enzyme peroxidase from horse radish (POD) (19). 200 μl sample with 800 μl PRS (phenol red solution) and 10 μl POD were combined (1:20) and measured at 610 nm.

Determination of catalase, superoxide dismutase, and reduced glutathione

Isolated RBCs were washed three times with 3 volumes ice-cold 0.9 mmol/l NaCl and hemolysates containing about 50 g Hb/l, prepared according to McCord and Fridovich (20), were used for the determination of catalase (CAT) activity. Determination of CAT activity was determined according to Beutler (21). Lysates were diluted with distilled water (1:7 v/v) and treated with chloroform–ethanol (0.6:1 v/v) to remove hemoglobin. Then 50 μl CAT buffer, 100 μl sample, and 1 ml 10 mM H_2O_2 were added to the samples. Detection was performed at 360 nm. Distilled water was used as a blank probe. Determination of superoxide dismutase (SOD) activity is based on epinephrine method of Misra and Fridovich (22). A 100 μl lysate and 1 ml carbonate buffer were mixed, and then epinephrine in a volume of 100 μl was added. Detection was performed at 470 nm. This method belongs to 'negative' type group of methods, since it monitors decrease of autoxidation speed in alkaline medium, which is dependent of O_2^- . The level of reduced glutathione (GSH) concentration was determined based on GSH oxidation with 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, using Beutler method (23). Measurement of the absorbance is carried out at a wavelength of maximum absorption of 420 nm.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the statistical package SPSS 20.0 for Windows. The results are expressed as means \pm standard deviation of the mean (SD). The differences between parameters in different time measurements were assessed by analysis of variance test with repeated measures and independent samples t-test as post hoc. The alpha level for significance was set to $p < 0.05$.



Table 1. Baseline characteristics of healthy subjects (controls) and patients with rheumatoid arthritis

Features of the participants	Controls	RA patients
Number of patients	48	42
Age (years)	54.15 (6.29)	54.81 (9.05)
Weight (kg)	71.75 (12.04)	72.02 (13.37)
Height (cm)	166 (6)	166 (6)
BMI (kg/m ²)	26.13 (3.90)	26.16 (4.87)
Disease duration (years)	/	12,81 (7.99)
Number of tender joints	/	5 (5)
Number of swollen joints	/	2 (2)
DAS28 - ESR	/	3.75 (1.09)
RF (IU/ml)	/	91.50 (71.43)
RF, n (%)	/	36 (85.71)
Anti-CCP antibodies (U/ml)	/	173.05 (128.68)
Anti-CCP antibodies, n (%)	/	40 (95.24)
Menopause (Yes/No)	34/14	31/11
Smokers, n (%)		
Current smokers	20 (41.7)	17 (40.5)
Non-smokers	20 (41.7)	19 (45.24)
Past smokers	8 (16.6)	6 (14.26)

The values are expressed as means \pm SD. **BMI** – Body Mass Index; **DAS28** – Disease Activity Score 28; **ESR** – Erythrocyte Sedimentation Rate; **RF** – Rheumatoid factor; **anti-CCP** – Anticyclic citrullinated polypeptide.

Table 2. Comparison of values of biochemical, hematological and hemostatic analysis between healthy subjects (controls) and patients with rheumatoid arthritis

Parameter	Controls	RA patients
ESR (mm/h)	13,33 (8,83)**	22,95 (13,50)
CRP (mg/L)	2,54 (2,40)**	11,55 (26,42)
Cholesterol (mmol/L)	6.50 (1.23)	6.06 (1.01)
Triglycerides (mmol/L)	1.5 (0.65)	1.49 (0.62)
HDL (mmol/L)	1.60 (0.30)	1.49 (0.29)
LDL (mmol/L)	4.21 (1.12)	3.81 (0.94)
Leukocytes (10 ⁹ /L)	6,51 (1,98)	7,58 (3,02)
Neutrophils (10 ⁹ /L)	3.77 (1.62)*	4.76 (2.69)
Neutrophils (%)	56,95 (6,40)**	61,92 (9,28)
Lymphocytes (%)	32,71 (5,68)**	27,87 (7,79)
Fibrinogen	3.26 (0.52)*	3.55 (0.69)
aPTT	28.16 (3.17)	28.35 (3.12)
PT	11.15 (0.67)**	11.89 (1.95)
INR	1.01 (0.06)**	1.08 (0.2)

The values are expressed as means \pm SD. Statistical significance between control and experimental group presented as* (p < 0.05); ** (p < 0.01). **ESR** – Erythrocyte Sedimentation Rate; **CRP** – C-reactive protein; **HDL** – High-Density Lipoprotein; **LDL** – Low-density lipoprotein; **aPTT** – activated partial thromboplastin time; **PT** – prothrombin time; **INR** – International Normalised Ratio.

RESULTS

Subjects characteristics

Demographic and clinical characteristics of the study population as well as results regarding the presence of traditional CV-risk factors are presented in Table 1. Thirty six out of 42 patients were RF seropositive and 40 of 42 had anti-CCP antibodies. There wasn't any statistical difference between healthy controls and patients regarding age, BMI and smoking.

Parameters of laboratory analysis

Patients with RA had higher ESR, CRP, fibrinogen levels as well as values of PT and INR. Furthermore, leukocyte formula showed higher percent of neutrophils and lower percent of lymphocytes in RA patients compared to healthy controls. Also, higher value of neutrophils was noticed in patients. These results can indicate increased inflammation and changes in hemostatic balance in RA patients. Results for biochemical, hematological and hemostatic analysis are presents in Table 2.

Redox status parameters

The dynamics of oxidative stress parameters (H₂O₂, O₂⁻, NO₂⁻ and TBARS) in healthy control and patients with rheumatoid arthritis are shown in Figure 1, while activities of the antioxidative enzymes (SOD, CAT, GSH) are shown in Figure 2.

Oxidative parameters

Values of hydrogen peroxyde were lower in healthy subjects compared to patients suffering of RA (0.82 \pm 0.33 vs. 1.05 \pm 0.41 nmol/min/g wt, respectively; p<0.01) (Fig 1a). When it comes to O₂⁻ values, there was no statistically significant difference between controls compared to patients (26.92 \pm 5.68 vs. 23.05 \pm 5.64 nmol/min/g wt, respectively) (Fig 1b). Values of nitrites were higher in control group relative to patients with RA (4.98 \pm 0.9 vs. 3.83 \pm 0.52 nmol/min/g wt, respectively; p<0.01) (Fig 1c). Futhermore, the same trend as for the H₂O₂ was noticed for TBARS. The values were lower in controls relative to RA patients (1.04 \pm 0.11 vs. 0.94 \pm 0.13 μ mol/min/g wt, respectively; p<0.01) (Fig 1d).

Activity of antioxidant parameters

Activity of CAT was statistically increased in control group compared to patients (3.39 \pm 0.58 vs. 3.10 \pm 0.51 U/gHbx10³, respectively; p<0.05) (Fig 2a). The same trend was noticed in SOD activity with statistically higher values in controls relative to RA group (23.57 \pm 5.27 vs. 13.95 \pm 5.80 U/gHbx10³, respectively; p<0.05) (Fig 2b). Values of GSH were not statistically different between controls and patients (75071.02 \pm 8616.41 vs. 69814.68 \pm 8503.38 nmol/ml RBCs, respectively) (Fig 2c).

Correlation

There was no correlation between the measurements of the serum oxidative stress markers and antioxidant capacity and diseases duration, DAS28, CRP, ESR, fibrinogen, the values of RF, anti-CCP antibodies.



DISCUSSION

In addition, it is well known that a pro-inflammatory mediator such as cytokines and prostaglandins plays an important role in the RA pathogenesis. However there is

strong evidence that oxidative stress has additional impact through the overproduction of ROS at inflammation sites. Oxidative stress occurs either due to the overproduction

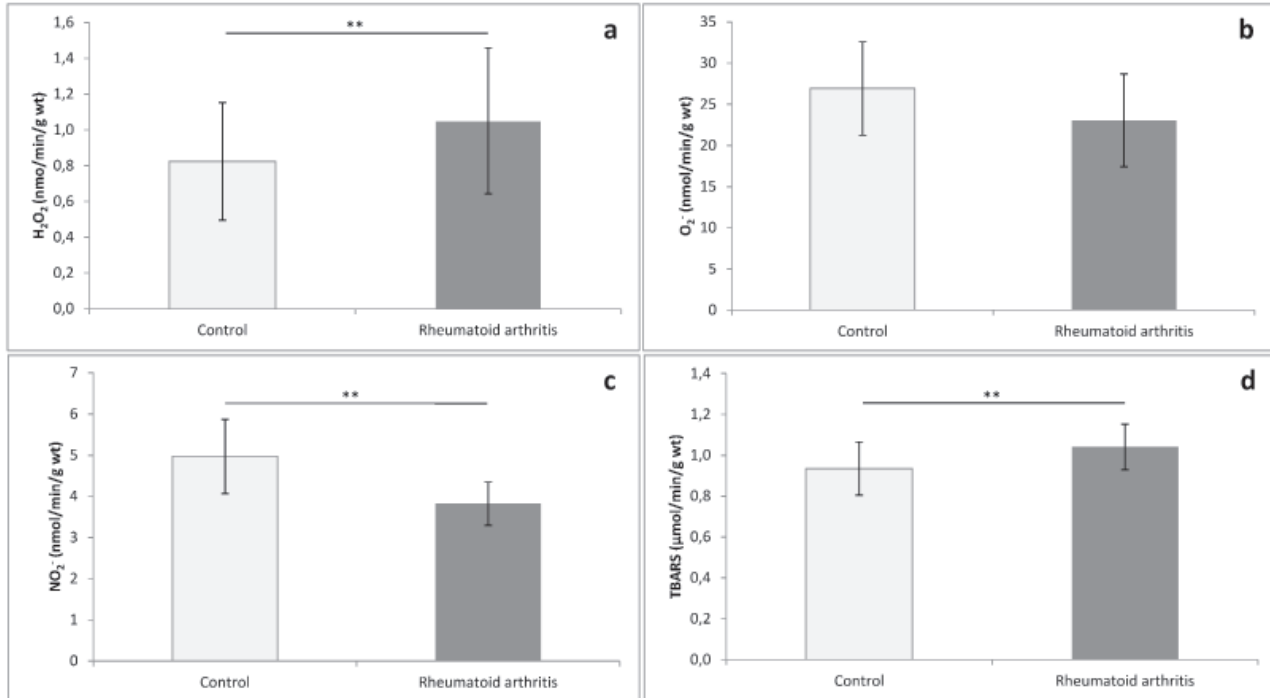


Figure 1. Oxidative stress parameters in control group compared to patients with rheumatoid arthritis. Data are presented as following: **a** – Level of hydrogen peroxide (H₂O₂); **b** – Level of superoxide anion radical (O₂⁻); **c** – Level of nitrites (NO₂⁻); **d** – Level of index of lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Data are expressed as mean ± SD (*p<0.05; **p<0.01).

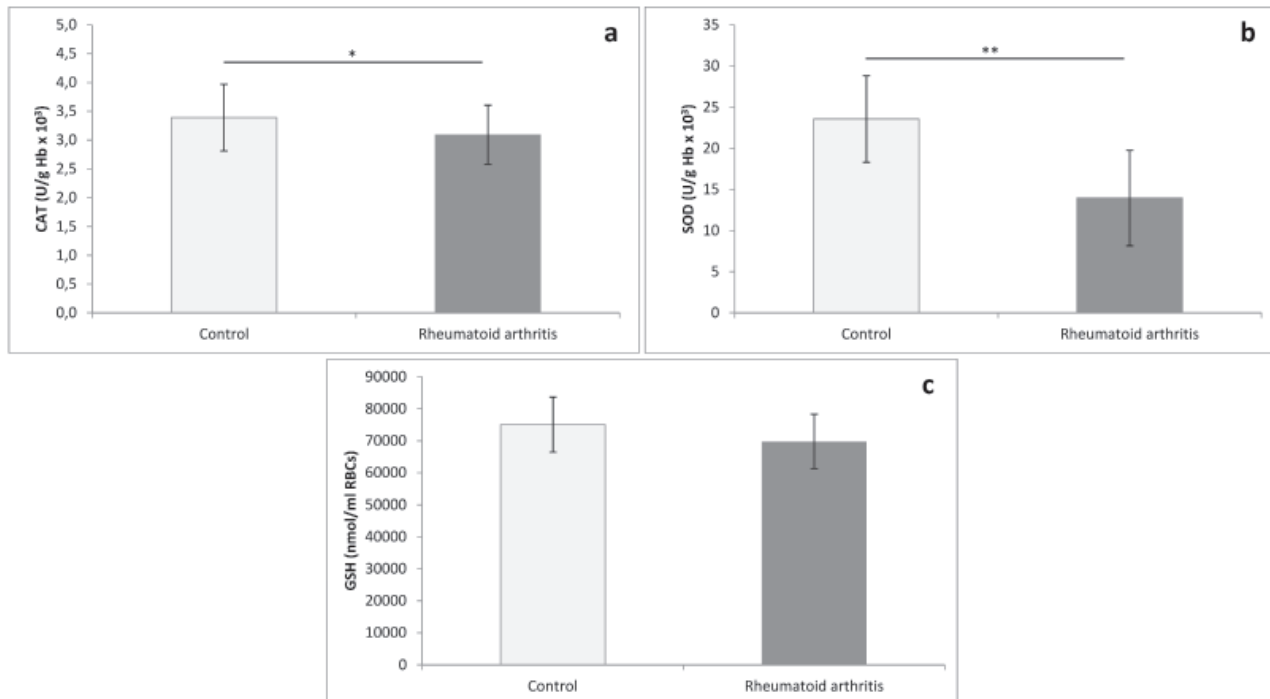


Figure 2. Activity of antioxidant parameters in control group compared to patients with rheumatoid arthritis. Data are presented as following: **a** – Catalase activity (CAT); **b** – Superoxide dismutase activity (SOD); **c** –Level of reduced glutathione (GSH). Data are expressed as mean ± SD (*p<0.05; **p<0.01).



of oxidants or their elimination weakness by antioxidant defense system. In this study, balance of pro-oxidative and oxidative parameters was assayed to gain insight into the oxidative stress status in RA.

Previously, it has been shown that NO values were statistically higher in patients with RA compared with healthy controls (1) (8) NO is a reactive nitrogen species produced mainly by macrophages and it is an important component of the oxidative burst during inflammation and autoimmunity. Interestingly, in our study, statistically higher values of nitrites were noticed in healthy control compared to patients suffering of RA (Fig 1c). Some of possible explanation for these results is in the fact that combined NO and superoxide anion radical can induce deadly peroxy-nitrite formation. Nitric oxide (NO) is produced by the deamination of L-arginine from nitric oxide synthase. This oxide reacts with superoxide radical in favor of peroxy-nitrite production (24). In our study we noticed lower values of O_2^- in patients compared to control group without statistical significance (Fig 1b). This can be result of the previously mentioned peroxy-nitrite synthesis due to primary higher values of NO and O_2^- in RA patients that induced reaction between themselves and reduce O_2^- and NO levels. O_2^- has a half-life of 10^{-6} of a second, and NO molecules last for few seconds, both of which support this possibility (25). Furthermore, it is quite possible that the highest values of NO is in inflammation is *in situ* on the original place of inflammation origin, in joints. It has been found that one more important source of NO were articular chondrocytes and synovial fibroblasts. During chronic inflammation in affected joints, different type of cells such as neutrophils, lymphocytes, mast cells and macrophages could result with increased production of NO (1). Kundu et al showed higher concentration of NO in different biological fluids. The levels of intracellular NO were 1.56 times higher in isolated monocytes from the blood of RA patients relative to healthy as well as in monocytes of the synovial infiltrate (12). Increased levels of the marker molecule for peroxy-nitrite, nitrotyrosine, were found in synovial fluid samples from rheumatoid patients (24). During long-term of disease duration and high disease activity measured as DAS28 it is possible that in the place of ROS origin in inflamed joint there is strong and fast reaction between NO and O_2^- and production of peroxy-nitrite. But, that remains unknown considering that in our study we didn't measure values of this radical.

The primary targets of ROS are double bonds in polyunsaturated fatty acids in the cell membrane, which increase lipid peroxidation (LPO) and result in more oxidative damage. Deleterious by-product is generated by oxidative damage mediated by ROS as well as a thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), malondialdehyde (MDA) which leads to synthesis of various adducts with protein inducing pathogenic antibodies and tissue damage in patients with RA. MDA has been reported as a primary biomarker of free radical induced lipid damage and oxidative stress (26). Increased LPO has been shown in previous studies confirming the presence of oxidative stress in rheumatoid arthritis. Vasanthi et al showed statistically higher values

of MDA in patients compared to control group (1). Desai and coworkers pointed out that mean level of blood malondialdehyde (in nmol/ml) in controls was lower compared to cases (27). Large number of previous studies indicated increased levels of MDA in RA patients relative to healthy subjects in different biological fluids (14, 28, 29). Pasupathi et al showed that level of plasma and erythrocyte thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was markedly increased in the rheumatoid arthritis patients when compared to control subjects (30) as well as Veselinovic et al (31) who correlate with our study.

In our study values of H_2O_2 were statistically increased in patients compared to controls (Fig 1a). That follows decreased CAT activity in RA patients due to detoxified concentration of H_2O_2 by CAT. Several studies in patients with RA documented evidence of increased values of H_2O_2 levels compared to healthy control. Veselinovic and coworkers noticed higher serum concentrations in RA patients compared to healthy subjects that correlate with our results (31). The higher values of H_2O_2 were noticed in previous study by Khojah et al (8).

In our study, statistically higher SOD and CAT activity as antioxidant defense system enzymes was noticed in controls as well as higher values of GSH without statistic significance in the same group (Fig 2a-c). These enzymes have an important function in antioxidant defense system. Catalase has a different role in physiological and pathological conditions. Under physiological condition, catalase has low affinity for H_2O_2 (compared to glutathione peroxidase) but CAT affinity increases due to increased concentration of H_2O_2 (15). Glutathione peroxidase uses reduced glutathione as hydrogen donor for metabolizing H_2O_2 to water. In addition, previous findings promoted glutathione (GSH), the main thiol antioxidant, as an important anti-inflammatory mediator (32). Two enzymes of antioxidative protection, glutathione peroxidase and catalase are very important in metabolism regulation of hydrogen peroxide which in excess can cause damage to DNA, RNA and lipids. The role of SOD is in superoxide anion neutralization one of the main ROS involved in inflammation (10).

Furthermore, SOD and CAT activity was higher in healthy subjects relative to patients (Fig 2 a-b). The same trend was noticed in Feijóo and coworkers research. In control group there were higher SOD and CAT activity compared to RA patients (7). Likewise, higher activity of SOD and CAT followed by decreased level of pro-oxidative parameters in healthy control compared to RA patients were noticed in other studies (14, 26, 27) that correlate to our results. In previous studies values of GSH were higher in control group compared to RA patients (7, 14, 26, 27). But, our results showed correlation with Cimen and coworkers study. They showed unchanged values of GSH in controls compared to RA patients (33).

Our results are in agreement with other recent studies that indicate that oxidative stress generated within an inflamed joint can produce connective tissue destruction leading to joint and periarticular deformities in RA.



CONCLUSION

This study confirmed that redox status in RA patients is changed and that antioxidant defense system is compromised in these patients. There is a shift in the oxidant/antioxidant balance in favor of lipid peroxidation, A marked increase in ROS formation and lipid peroxidation as well as decrease in the activity of antioxidant defense system can lead to oxidative stress which may contribute to the tissue and cartilage damage observed in RA and hence to the chronicity of the disease. These results may suggest a potential benefit from exogenous antioxidant supplements in women with RA.

REFERENCES

1. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2009; 12(1): 29-33. DOI: 10.1111/j.1756-185X.2009.01375.x.
2. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016; 388(10055): 2023-38. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
3. Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(7): 1316-22. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204627.
4. Ungurianu A, Margină D, Grădinaru D, Băcanu C, Ilie M, Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Spandidos DA, Tsatsakis AM. Lipoprotein redox status evaluation as a marker of cardiovascular disease risk in patients with inflammatory disease. *Mol Med Rep* 2017; 15(1): 256-62. DOI: 10.3892/mmr.2016.5972.
5. Oliver JE, Silman AJ. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 2009; 11(5): 252. DOI: 10.1186/ar2825.
6. Sokka T, Toloza S, Cutolo M et al. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(1): R7. DOI: 10.1186/ar2591.
7. Feijóo M, Túnez I, Ruiz A, Tasset I, Muñoz E, Collantes E. Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage. *Reumatol Clin* 2010; 6(2): 91-4. DOI: 10.1016/j.reuma.2008.12.016.
8. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, Hamza AB. Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2016; 97: 285-91. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.020.
9. Vaya J. Exogenous markers for the characterization of human diseases associated with oxidative stress. *Biochimie* 2013; 95(3): 578-84. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.03.005.
10. Mateen S, Moin S, Zafar A, Khan AQ. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clin Chim Acta* 2016; 463: 4-10. DOI: 10.1016/j.cca.2016.10.007
11. Bates EJ, Lowther DA, Handley CJ. Oxygen free-radicals mediate an inhibition of proteoglycan synthesis in cultured articular cartilage. *Ann Rheum Dis*. 1984; 43(3): 462-9. DOI: 10.1136/ard.43.3.462
12. Kundu S, Ghosh P, Datta S, Ghosh A, Chattopadhyay S, Chatterjee M. Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free Radic Res* 2012; 46(12): 1482-9. DOI: 10.3109/10715762.2012.727991.
13. Tiku ML, Shah R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 2000; 275: 20069-76. DOI: 10.1074/jbc.M907604199
14. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* 2016; 11(4): e0152925. DOI: 10.1371/journal.pone.0152925.
15. Kalpakcioglu B, Senel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27(2): 141-5. DOI: 10.1007/s10067-007-0746-3
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PI, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-8. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-x.
18. Auclair C, Voisin E. Nitrobluetetrazolium reduction. In: Greenwald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRP Press, Boca Raton 1985: pp 123-32.
19. Pick E, Keisari Y. A simple colometric method for the measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38: 161-70.
20. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; , 244: 6056-63.
21. Beutler E. Catalase. In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York 1982, pp 105-6.
22. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxidedismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-5.
23. Beutler E. Reduced glutathione (GSH). In: Beutler E (ed) *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods*. Grune and Stratton, New York 1975, pp 112-4.
24. Bauerová K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18 Spec No: 15-20. DOI: 10.1007/978-3-642-18619-6.



25. Ristic P, Srejsovic I, Nikolic T, Stojic I, Ristic D, Zivkovic V, Jakovljevic VL. The effects of zofenopril on cardiac function and pro-oxidative parameters in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem* 2017; , 426(1-2): 183-93. DOI: 10.1007/s11010-016-2890-z
26. Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A. Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 2011; 216(9): 1010-7. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.04.001.
27. Desai PB, Manjunath S, Kadi S, Chetana K, Vanishree J. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14(11): 959-67.
28. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta* 2003; 338(1-2): 123-9. DOI: org/10.1016/j.cccn.2003.08.011
29. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 2005; 38(11): 981-6. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.08.003.
30. Pasupathi P, Deepa M, Rani P, Sankar RR. Circulating lipid peroxidation, plasma and erythrocyte antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 2009; 35(2): 57-62. DOI:10.3329/bmrcb.v35i2.2798
31. Veselinovic M, Barudzic N, Vuletic M, Zivkovic V, Tomic-Lucic A, Djuric D, Jakovljevic V. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Mol Cell Biochem* 2014; 391(1-2): 225-32. DOI: 10.1007/s11010-014-2006-6.
32. Al Arfaj AS, Chowdhary AR, Khalil N, Ali R. Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol* 2007; 124: 83-9. DOI: org/10.1016/j.clim.2007.03.548
33. Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2000; 19(4): 275-7. DOI:10.1007/pl00011172
34. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(1): 44-8. DOI:10.1002/art.1780380107