



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Процена функције ендотела и васкуларног  
ремоделовања код пацијената са реуматоидним  
артритисом**

Докторска дисертација

Др Мирјана Веселиновић

КРАГУЈЕВАЦ, 2012.



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Процена функције ендотела и васкуларног  
ремоделовања код пацијената са реуматоидним  
артритисом**

Докторска дисертација

Др Мирјана Веселиновић

Ментор Проф др Драган Ђурић

КРАГУЈЕВАЦ, 2012.

## ЗАХВАЛНИЦА

Овом приликом се захваљујем свом ментору Проф др Драгану Ђурићу и Проф др Владимиру Јаковљевићу на иницијативи коју су показали код избора теме, као и на активном учешћу у извођењу истраживања. Својим несебичним стручним саветима су помагли у уобличавању ове докторске дисертације.

Истичем захвалност и Владимиру Живковић, Милени Вулетић и Невени Баруцић на обављеним биохемијским анализама потребним за реализацију ове докторске тезе, хематолошкој лабораторији КЦ „Крагујевац“, Проф др Славчо Тончеву на стручној помоћи за израду ове докторске дисертације.

Такође се захваљујем Проф др Милану Петронијевић и Доц др Небојши Тасић на моралној подршци и стручном саветовању.

Огромну захвалност дугујем својој породици на безрезервној подршци и разумевању током израде ове докторске дисертације.

### ***I. Аутор***

Име и презиме:	Мирјана Веселиновић
Датум и место рођења:	26.02.1974. Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење:	Интерниста-реуматолог, Интерна клиника, Клинички Центар Крагујевац; Асистент-сарадник у настави, Медицински факултет, Крагујевац

### ***II. Докторска дисертација***

Наслов:	Процена функције ендотела и васкуларног ремоделовања код пацијената са реуматоидним артритисом
Број страница:	231
Број слика:	40/16/5
Број библиографских података:	416
Установа и место где је рад израђен:	Одељење Реуматологије, Клинички Центар Крагујевац, Крагујевац Катедра за физиологију, Медицински факултет, Крагујевац;
Научна област (УДК):	Медицина (Физиологија, Интерна медицина)
Ментор:	Проф. др Драган Ђурић

### ***III. Оцена и одбрана***

Датум пријаве теме:	17.11.2010.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	532/13 13.04.2011.

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

	Проф. др Драгн Ђурић, председник Проф. др, Владимир Љ. Јаковљевић, члан Проф. др, Немања Дамјанов, члан
--	---

Комисија за оцену докторске дисертације:

	Проф. др Владимир Љ. Јаковљевић, председник Доц. др Небојша Тасић, члан Проф. др Милан Петронијевић, члан
--	---

Комисија за одбрану докторске дисертације:

	Проф. др Владимир Љ. Јаковљевић, председник Доц. др Небојша Тасић, члан Проф. др Милан Петронијевић, члан
--	---

## САДРЖАЈ

<b>1.УВОД</b> .....	1
<b>1.1.Реуматоидни артритис</b> .....	2
1.1.1. Дефиниција, имунопатогенеза, лечење.....	2
1.1.2. Кардиоваскуларни морбидитет и морталитет у реуматоидном артритису.....	5
1.1.3. Атеросклероза и реуматоидни артритис.....	7
1.1.3.1. Улога инфламације у атеросклерози у реуматоидном артритису.....	7
1.1.3.1.1. Улога инфламације у промени липидног статуса у реуматоидном артритису.....	8
1.1.3.1.2. Улога инфламације у оксидативном стресу у реуматоидном артритису.....	9
1.1.3.1.3. Улога инфламације у ендотелној дисфункцији у реуматоидном артритису.....	9
1.1.3.1.4. Улога инфламације у коагулантном систему у РА.....	10
1.1.3.2. Потенцијални не-инфламаторни механизми који повећавају КВ ризик у РА.....	10
1.1.3.2.1. КВ токсичност антиреуматских лекова.....	10
1.1.3.2.1.1. Кортикостероиди.....	10
1.1.3.2.1.2. Метотрексат.....	11
1.1.3.2.1.3. Биолошка терапија.....	11
1.1.3.2.1.4. Нестероидни антиинфламаторни лекови.....	12
1.1.3.2.2. Генетски полиморфизам у РА повећава КВ ризик.....	12
<b>1.2.Ендотел</b> .....	13
1.2.1. Хистолошке карактеристике ендотела.....	13
1.2.2. Физиолошка улога ендотела.....	15
1.2.2.1. Улога ендотелних ћелија у ангиогенези.....	16
1.2.2.2. Транспортна улога ендотела.....	17
1.2.2.3. Улога ендотелних ћелија у процесима коагулације и фибринолизе.....	17
1.2.2.4. Улога ендотела у регулацији васкуларног тонуса.....	21
1.2.2.4.1. Азот моноксид - синтеза и физиолошка улога.....	23

1.2.2.5. Улога ендотела у регулацији структуре кардиоваскуларног система.....	27
1.2.2.6. Улога ендотела у инфламацији и модулацији имунолошког одговора.....	29
1.2.2.7. Антиатеросклеротска улога ендотела.....	31
1.2.3. Ендотелна дисфункција.....	32
1.2.3.1. Значај тангенијалне силе смицања крвне струје (shear stress-a) за настанак ендотелне дисфункције.....	33
1.2.3.2. Значај оксидативног стреса за настанак ендотелне дисфункције.....	36
1.2.4. Испитивање ендотелне функције.....	39
1.2.4.1. Процена ендотелне функције на основу циркулишућих маркера.....	41
1.2.4.2. Процена ендотелне функције неинвазивним методама.....	42
1.2.4.2.1. Процена ендотелне функције на основу ендотел-зависне вазодилатације...	45
1.2.4.2.1.1. Техника процене ендотелне функције методом протоком иззаване вазодилатације брахијалне артерије.....	47
<b>1.3. Оксидационо-редукциони процеси.....</b>	<b>49</b>
1.3.1. Слободни радикали.....	49
1.3.1.1. Реактивне кисеоничне врсте (ROS).....	50
1.3.1.2. Настанак и особине појединих ROS.....	52
1.3.1.2.1. Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	52
1.3.1.2.2. Водоник пероксид ( $H_2O_2$ ).....	55
1.3.1.2.3. Хидроксил радикал ( $\bullet OH$ ).....	58
1.3.1.2.4. Синглет кисеоник ( $^1O_2$ ).....	60
1.3.1.2.5. Липидна пероксидација .....	61
1.3.1.2. Реактивне азотне врсте.....	66
1.3.1.2.1. Азот моноксид (NO).....	67
1.3.2. Антиоксидативни заштитни систем.....	73
1.3.2.1. Ензимске компоненте антиоксидационог заштитног система.....	75
1.3.2.1.1. Супероксид дисмутаза (SOD).....	75
1.3.2.1.2. Каталаза (CAT).....	77
1.3.2.3.2. Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система.....	78
1.3.2.3.2.1. Глутатион (GSH).....	78
<b>2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>82</b>

<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	85
3.1. Испитаници.....	86
3.2. Ултразвучни преглед – методологија рада.....	88
3.2.1. Одређивање intima medija tiknes a. carotis communis.....	88
3.2.2. Одређивање ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије.....	89
3.3. Биохемијске анализе.....	90
3.3.1. Одређивање антигена за Фон Вилебрандов фактора (vWFAg).....	90
3.3.2. Одређивање активности фон Вилебрандовог фактора (vWFAct).....	91
3.3.3. Одређивање параметара оксидационог стреса.....	92
3.3.3.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ).....	92
3.3.3.2. Одређивање концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ ).....	93
3.3.3.3. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS).....	94
3.3.3.4. Одређивање концентрације азот монооксида ( $NO\cdot$ ).....	95
3.3.3.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD).....	96
3.3.3.6. Одређивање активности каталазе (CAT).....	98
3.3.3.7. Одређивање активности глутатиона (GSH).....	99
3.4. Статистичка обрада података.....	100
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	101
4.1. Поређење параметара и разлика између групе пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе.....	102
4.1.1. Клинички и демографски параметри код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе.....	102
4.1.2. Лабораторијски параметри код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе.....	103
4.1.3. Маркери запаљења и ендотелне активације код пацијената са РА и контролне здраве групе сличних година старости и пола.....	108
4.2. Поређење између средњих вредности дебљине зида каротидне артерије (IMT) пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе.....	114
4.2.1. Демографски и лабораторијски параметри и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом.....	115

4.2.2. Функционални и лабораторијски параметри и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом .....	116
4.2.3. Демографски и лабораторијски параметри и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије у контролној групи.....	117
4.2.4. Утицај радиционалних кардиоваскуларних фактора ризика на вредности ИМТ каротидне артерије у групи испитаника.....	118
4.2.5. Корелација између дебљине зида каротидне артерије и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом и код контролне групе.....	120
4.2.6. Повезаност између употребе лекова и средње вредности дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом.....	123
4.2.7. Логистичка регресиона анализа - Одређивање параметара разлике између пацијената са реуматоидним артритисом и испитаника у контролној групи у односу на вредности ИМТ каротидне артерије.....	124
4.2.8. Динамика биохемијских параметара - Сензитивност и специфичност у дијагностиковању повећаних вредности ИМТ каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом.....	127
4.2.9. Мултиваријантна регресиона анализа - Одређивање параметара разлике између испитаника са реуматоидним артритисом који имају и који немају повећане вредности ИМТ каротидне артерије .....	128
4.3. Мерење дилатације брахијалне артерије изазване протоком код пацијената са РА и контролном групом.....	129
4.3.1. Корелација између дебљине зида каротидне артерије и дијаметара, протока и ендотел-зависна дилатација изазвана протоком у брахијалној артерији код пацијената са реуматоидним артритисом и код контролне групе.....	131
4.3.2. Утицај традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика на вредности ендотел-зависна дилатација изазвана протоком у брахијалној артерији у групи испитаника.....	133
4.3.3. Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе.....	135



4.3.4. Повезаност између употребе лекова и средње вредности ED-FMD код пацијената са реуматоидним артритисом.....	138
4.4. Параметри оксидационог стреса.....	139
4.4.1. Разлике у параметрима оксидативног стреса између пацијената са реуматидним артритисом и контролне групе.....	139
4.4.2. Корелација између дебљине зида каротидне артерије и параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе.....	147
4.4.3. Параметри оксидативног стреса и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом и код контролне групе.....	149
4.4.4. Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком и параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним.....	151
4.4.5. Параметри оксидативног стреса и преваленца патолошког индекса атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом артритисом и код контролне групе.....	153
4.4.6. Параметри оксидативног стреса и активност болести код пацијената са реуматоидним артритисом.....	154
4.4.7. Параметри оксидативног стреса и вредности Ц реактивног протеина код пацијената са реуматоидним артритисом.....	155
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>156</b>
5.1. Повезаност параметара запаљења и атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом.....	157
5.2. Промене у структури а.carotis communis код пацијената са реуматоидним артритисом.....	160
5.3. Повезаност традиционалних фактора ризика за кардиоваскуларне болести и ИМТ а.carotis communis код пацијената са реуматоидним артритисом.....	162
5.4. Повезаност биохемијских параметара коагулације и атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом.....	165
5.5. Повезаност нетрадиционалних фактора ризика за кардиоваскуларне болести и ИМТ а.carotis communis код пацијената са реуматоидним артритисом.....	169

5.6. Вредности ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом.....	173
5.7. Повезаност терапије и ране атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом.....	177
5.8. Параметри оксидационог стреса- поређење у односу на вредности ИМТ а.carotis communis и ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом.....	181
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>190</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>193</b>

**I**

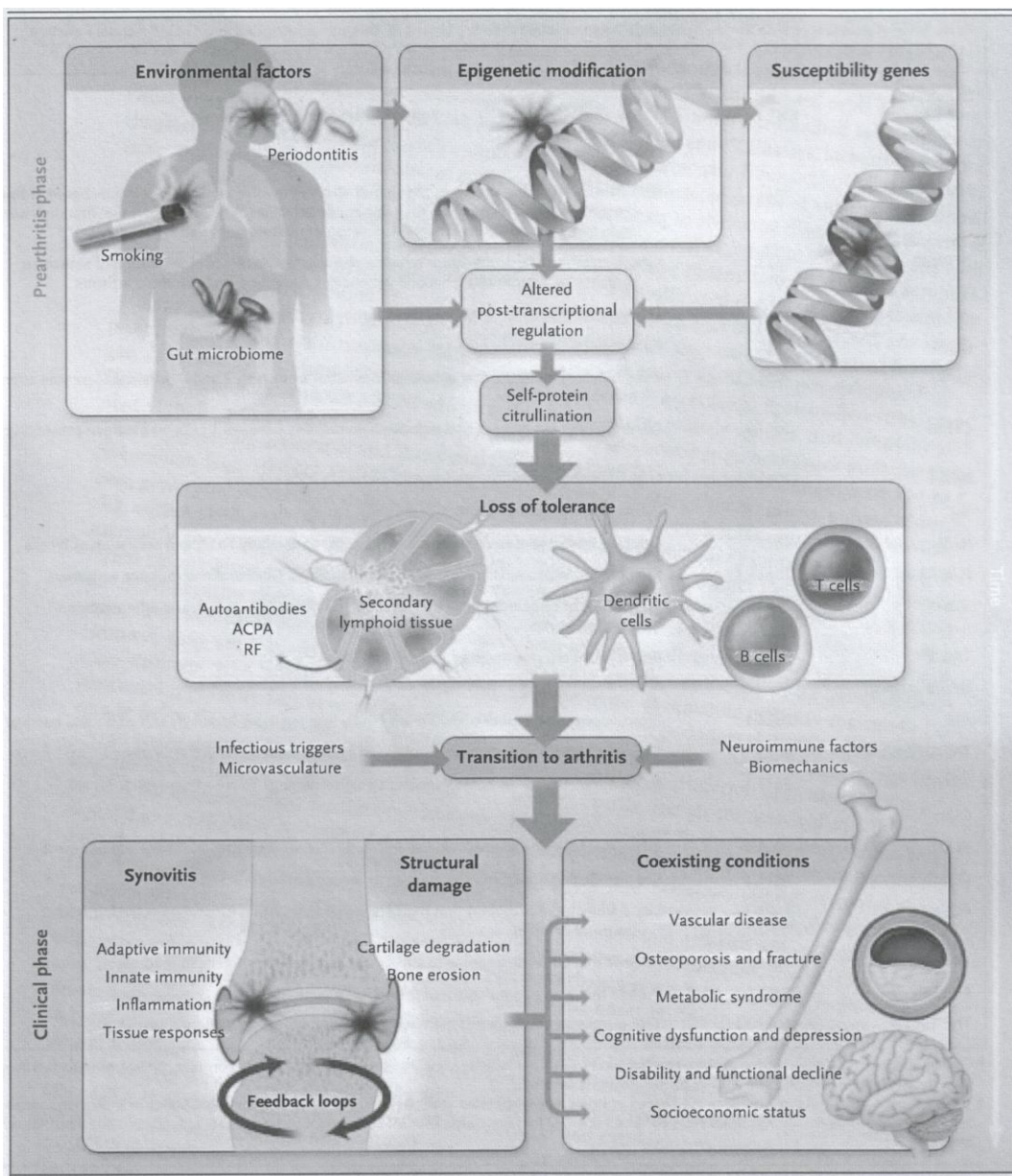
**УВОД**

## 1.1. РЕУМАТОИДНИ АРТРИТИС

### 1.1.1. Дефиниција, имунопатогенеза, лечење

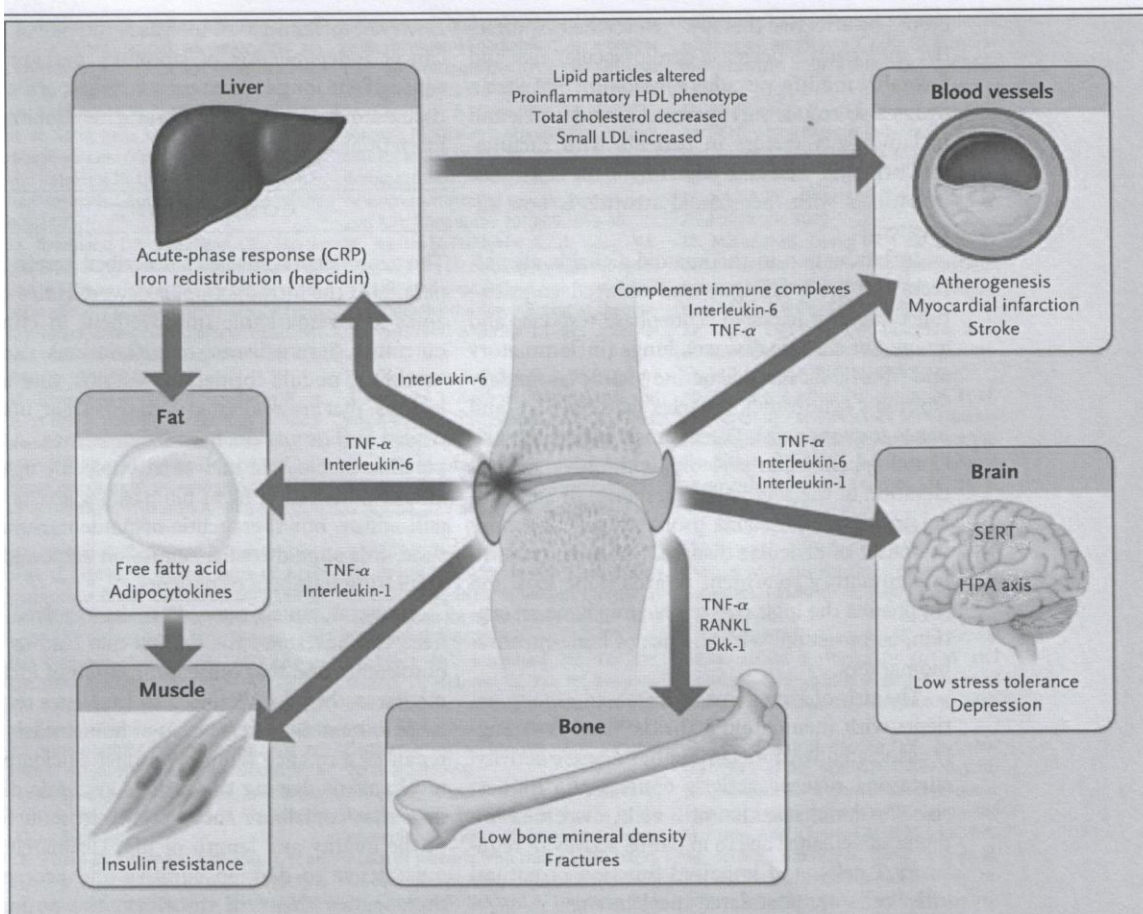
Реуматоидни артритис (РА) је хронична системска, инфламаторна болест која се манифестује хроничном упалом зглобова, променљивог тока и трајања, од које болује око 0,8% популације. Чешћа је код жена него код мушкараца. Испољава се болом, отоком и укоченошћу и постепеним оштећењем функције зглобова (Harris *et al*, 2005).

Слика 1. Фазе у развоју реуматоидног артритиса



Узрок реуматоидног артритиса је непознат. Претпоставка је да делују фактори спољашње средине и генетски фактори на губитак толеранције имуног система на сопствене протеине (Слика 1). Недовољно је познато како запаљење настаје првенствено у зглобовима касније се манифестује и захваћеношћу других органских система. Реуматоидни артритис карактерише запаљење и хиперплазија синовије, продукција аутоантитела (реуматоидни фактор и антитела на циклични цитрулисани пептид), разарање хрскавице и кости и системске манифестације, укључујући кардиоваскуларна, пулмолошка, психијатријска и скелетна обољења (McInnes, 2012) (Слика 2).

**Слика 2. Механизми развоја дугорочних компликација у реуматоидном артритису**

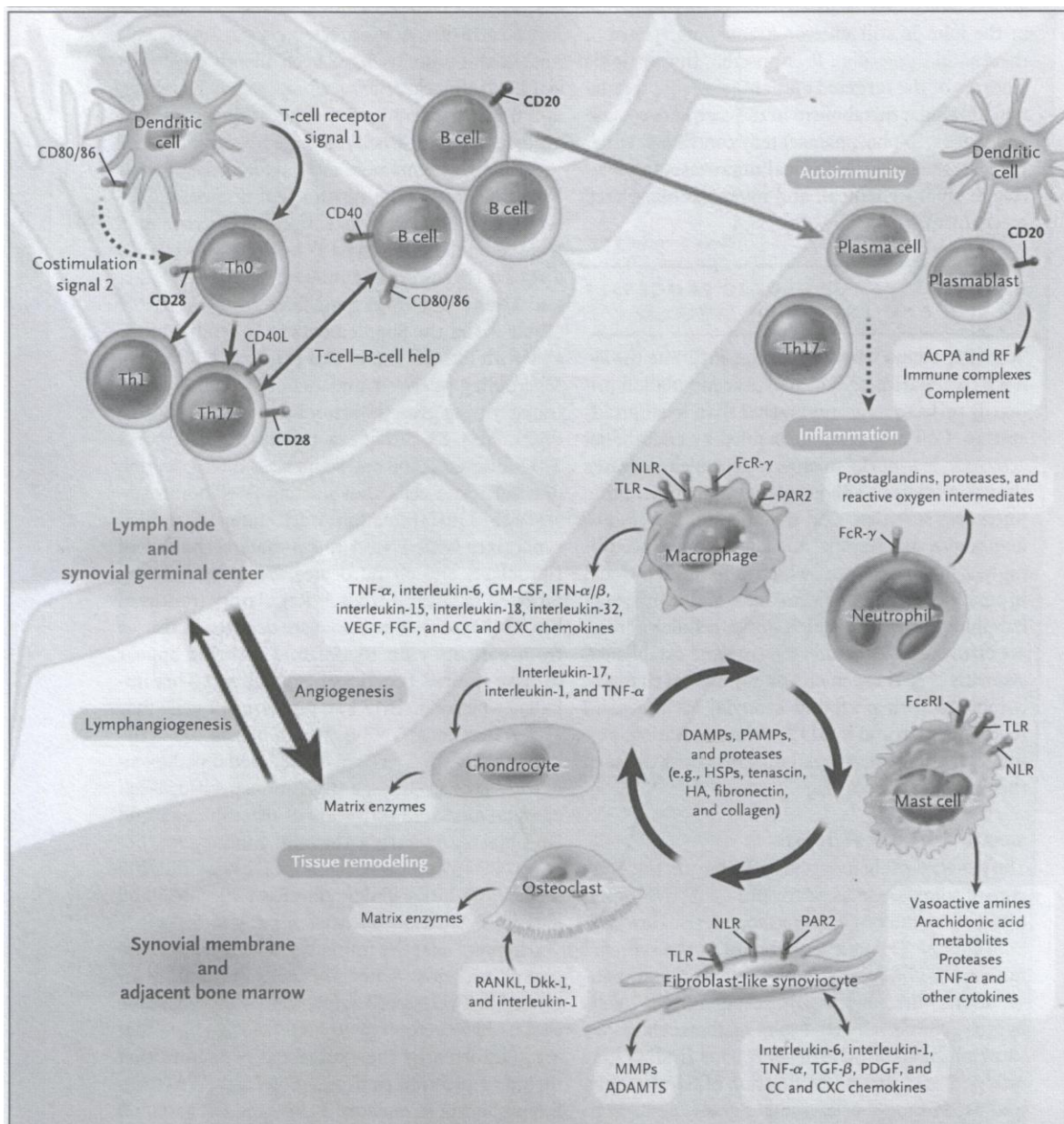




## Имунопатогенеза

Главни патолошки процес у РА је запаљење, за које се претпоставља да је настало као последица нетолеранције организма на до данас непознате антиген. Главно место запаљења зглобова је синовијална мембрана.

## Слика 3. Модификације имуног система у зглобу код реуматоидног артритиса



Пре 30-ак година је откривено да постоји повезаност између појаве РА и *HLA-DR* гена главног комплекса хистокомпатибилности (*MHC*). С обзиром да је *MHC* одговоран за презентацију антигена, откриће генетске компоненте је усмерило истраживања на презентацију антигена и улогу лимфоцита и других ћелија у патогенези РА. Данас се зна да запаљење зглобова у РА одликује инфилтрацијом синовијалне мембране Т- и Б- лимфоцитима, макрофагима, другим мононуклеарним ћелијама и хиперплазијом ћелија синовијалне мембране (Слика 2). Остале значајне ћелије су дендритичне ћелије, *NK* ћелије и мастоцити. Међусобна повезаност и комплексне интеракције између ћелијских и солубилних елемената (цитокини) аутоимунског одговора у РА највероватније доводе до локалних и системских клиничких обележја ове болести (Braunwald et al. 2001; Firestein et al, 2005).

### Лечење

Лечење РА треба започети одмах по постављању дијагнозе, а треба га спроводити док је то неопходно (најчешће доживотно). РА се лечи лековима који мењају ток болести - ЛМТБ, биолошким лековима, нестероидним антиинфламаторним лековима - НСАИЛ) и другим мерама (обука болесника, социјални рад, физијатријско и хируршко лечење) (Harris et al.,2005).

#### **1.1.2. Кардиоваскуларни морбидитет и морталитет у реуматоидном артритису**

Још од 1950.године је публиковано да пацијенти са РА имају повећан ризик од превремене смрти (Cobb et al, 1953.). У популационој студији у Великој Британији која је укључила 2.37 милиона испитаника показано је да је стопа морталитета у испитаној групи 1.6, а да стопа морталитета због КВ догађаја износи 1.5 код пацијената са РА у односу на оне који нису имали артритис (Watson et al, 2003). То би значило просечно 10-15 година краћи животни век пацијената са РА у односу на општу популацију. Wolf и сарадници су објавили да је стопа морталитета просечно 2.3 у популацији од 3501 пацијента са РА који су праћени преко 35 година, и бележене су све кардиоваскуларне (КВ) и цереброваскуларне болести које су имале смртни исход (Wolfe et al,1994).

У општој популацији индекс смртности расте после 50 године живота док у РА нема корелације у односу на старосну доб, што прави велику разлику у индексу, без обзира што је у новије време постигнут напредак у лечењу РА (Gonzalez *et al*, 2007). Мета-анализа која је обухватила 24 студије са РА, показала је да је 50% повећан ризик од смрти узроковане КВ болестима (Aviña-Zubieta *et al*, 2008). Подаци из Норфолк регистра за артритисе, где су праћени пацијенти са раним артритисом просечно 7 година, показују високу стопу морталитета (1.4 до 2.0). Најчешћи узрок смрти су биле КВ болести (47% код жена и 33% код мушкараца) (Goodson *et al*, 2002).

Повећан КВ морбидитет и морталитет код пацијената са РА не може се у потпуности објаснити са традиционалним факторима ризика за КВ болести. У проспективној популационој студији (Solomon *et al*, 2003) која је трајала у просеку 2.4 година, укључено је било 114 342 жена и регистровано је да је 2 пута већи ризик за настанак акутног инфаркта миокарда код жена са РА него код жена без РА. Подаци из Базе пацијената лекара опште праксе у Великој Британији који су укључили 8688 пацијената који су први пут имали инфаркт миокарда и 33923 пацијената који су поређени као контрола, показују да је 1.47 пута већи ризик за настанак акутног инфаркта миокарда код пацијета са РА него код пацијената без РА (Fisher *et al*, 2004). РА пацијенти имају 2 до 3 пута већи ризик за настанак инфаркта миокарда, 2 пута већи ризик за настанак конгестивне срчане слабости, 2 пута већи ризик од напрасне смрти и 1.7 пута већи ризик од цербероваскуларног инсульта (Solomon *et al*, 2003; Wolfe *et al*, 2003; Nicola *et al*, 2005; Maradit –Kremers *et al*, 2005). У студијама је показано да пацијенти са РА имају чак већу стопу кардиоваскуларног морбидитета у односу на болеснике оболеле од шећерне болести (Peters *et al*, 2009). Европска лига за реуматизам (ЕУЛАР) је објавила препоруке за скрининг, превенцију и третман КВ болести у артритисима на основу медицине засноване на доказима –ниво доказа Б, Ц, Д (Peters *et al*, 2010). Због наведених доказа код пацијената са РА потребно је урадити рани скрининг за кардиоваскуларне болести користећи неинвазивне дијагностичке технике и/или лабораторијске маркере.



### **1.1.3. Атеросклероза и реуматоидни артритис**

Атеросклероза, раније описивана као пасивна акумулација липида, сада се проучава као динамична, инфламаторна болест која почиње активацијом ендотела, мобилизацијом леукоцита, оксидацијом липида и кулминира са дестабилизацијом плака и тромбозом (Libby, 2008). Велика сличност се може наћи у патогенези атеросклерозе и РА, као прототипу хроничне, системске инфламаторне болести (Pasceri and Yeh, 1999). Проучавајући нестабилни атеросклеротски плак и инфламирану реуматоидну синовију пронађене су сличности у акумулацији инфламаторних моноцита, макрофага и Т ћелија. Атеросклероза и РА имају сличан профил системске и локалне имуне активности: активација Т ћелија и мастоцита, стварање инфламаторних цитокина: тумор некрозис фактор-алфа (TNF- $\alpha$ ) и интерлеукин 6 (IL6), повећавање екстрацелуларнимх металопротеиназа и висока експресија леукоцитних адхезионих молекула (Libby, 2008). Атеросклероза као и РА су повезани са смањењем Th 1 имуног одговора (Pasceri and Yeh, 1999). Најчешће место запаљења у РА је синовија одакле се проинфламаторни цитокини као TNF- $\alpha$  и IL6 ослобађају у системску циркулацију и имају многе ефекте на удаљене органе, укључујући масно ткиво, скелетне мишиће, јетру, имуни систем, хемтолошки систем и ендотел (Sattar *et al*, 2003). Резултат тога је ланчана реакција у организму која је везана за системску инфламацију и води ка про-атерогеном профилу: атерогенетски липидни поремећаји, оксидативни стрес, смањење ендотелних прогениторских ћелија због чега је смањена способност репарације лезија ендотела, смањење артеријске еластичности, инсулинска резистенција, ендотелна дисфункција, хиперкоагулабилно стање, повећање нивоа хомоцистеина и повећан број атерогених Т ћелија (Ku *et al*, 2009).

#### **1.1.3.1. Улога инфламације у атеросклерози у РА**

У атеросклерози, као и РА, повећане су серумске вредности параметара акутне фазе запаљења, као што је Ц-реактивни протеин (CRP), серумски амилоид А и фибриноген (Ross, 1999). Неколико популационих студија које су пратиле здраве мушкарце и жене показале су везу између CRP (иако је био у оквиру референтних

лабораторијских вредности) и ризика за настанак инфаркта миокарда и исхемијске цереброваскуларне болести (Clark *et al*, 2011; Wennberg *et al*, 2012; Koenig *et al*, 1999). Мета анализа која је обухватила 47 епидемиолошких студија из 15 земаља са укупно 194 418 испитаника, показала је да је ниво CRP у корелацији са настанком коронарне болести срца (C Reactive Protein Coronary Heart Disease Genetics Collaboration *et al*, 2011). Друга мета-анализа је укључила у испитивање 54 проспективне студије са 160 309 испитаника који у почетку нису имали КВ болести. Доказана је повезаност високих вредности CRP и настанка коронарне болести срца, цереброваскуларних болести, КВ морталитета као и смртог исхода због малигнитета и пулмолошких болести (Emerging Risk Factors Collaboration, 2010). Иако чак и ниска вредност параметара инфламације може предвидети КВ догађај у општој популацији, разумљива је хипотеза да хронична, системска инфламација у РА може утицати на повећан број КВ болести у овој популацији. (Wolfe *et al*, 2003). Ова хипотеза је потврђена када је доказано да различити параметри активности болести (повећан број отечених и осетљивих зглобова, екстраартикуларне манифестације болести и висока седиментација еритроцита) могу бити предиктори за морталитет у РА (Wolfe *et al*, 2003; Book *et al*, 2005).

#### **1.1.3.1.1. Улога инфламације у промени липидног статуса у РА**

Познато је да инфламација мења липопротеине и те прве промене се не могу детектовати рутинским лабораторијским анализама (Libby *et al*, 2002). Инфламација мења величину и густину липопротеине мале густине (LDL) (Khovidhunkit *et al*, 2004). TNF- $\alpha$  повећава оксидацију LDL, почетне и критичне фазе у атеросклерози, стимулишући секрецију супероксид-анјон радикала из моноцита и ендотелних ћелија (Maziere *et al*, 1994). Инфламација такође мења липопротеине високе густине (HDL) смањујући њихову способност да уклањају холестерол из атеросклеротских лезија и смањује њихову антиоксидативну активност (Van Lenten *et al*, 2006). Многе студије су доказале да се ове промене липопротеина догађају у РА. Повећање нивоа LDL у РА 3 пута повећава ризик за КВ болести (Hurt-Camejo *et al*, 2001). Смањење нивоа HDL које је доказано у РА

вероватно је последица повећаног лучења фосфолипазе 2-ПА која је у корелације са CRP а који одражава инфламацију у РА (Hurt-Camejo *et al*, 2001). Хронична инфламација, као у РА, води ка повећању LDL и смањењу HDL што се описује као атерогени индекс А1. (Sherer and Shoenfeld, 2006)

#### 1.1.3.1.2. Улога инфламације у оксидативном стресу у РА

Почетак атеросклерозе лежи у оксидацији липопротеинских честица мале густине, када долази до њихових физичко-хемијских промена (Radak, 2006). Оксидативна активност у РА позитивно корелише са реактантима акутне фазе запаљења као што су церулоплазмин. док негативно корелише са антиоксидантима као што су витамин А и Е (Sarban *et al*, 2005; Honaken *et al*, 1989). TNF- $\alpha$  блокира разградњу асиметричних диметил-Л аргинина (ADMA), ендогеног инхибитора азот-моноксид синтетазе (NOS). Повећан ниво ADMA, што је потврђено у РА, показатељ је оксидативног стреса и указује на ризик од КВ болести (Deanfield *et al*, 2007). Нитротирозин, који се ствара када азот моноксид одреагује са супероксид анјоном, такође је повећан у РА (Ikonomidis *et al*, 2009). Код РА пацијената је повећан оксидативни стрес и смањена је антиоксидативна активност.

#### 1.1.3.1.3. Улога инфламације у ендотелној дисфункцији у РА

Ендотелна дисфункција означава почетак атеросклерозе (Förstermann, 2010). Она се манифестује као смањено стварање и/или ослобађање азот-моноксида (NO) у одговору ендотела на редокс сигнале (Cai and Harrison, 2000). Резултат тога је продукција цитокина, адхезионих молекула, привлачења леукоцита и настанак инфламације у ендотелу. Постоје бројни докази ендотелне дисфункције у РА (Abbot *et al*, 1999). Цитокини, укључујући TNF- $\alpha$ , интерферон-гама ( $\gamma$ ), интерлеукин 1 (IL 1) и интерлеукин 4 (IL 4) повећавају експресију ендотелног адхезионог молекула познатог као васкуларни адхезиони молекул 1, што је прва фаза атеросклерозе (Libby, 2008). TNF- $\alpha$  смањује концентрацију NO, блокирањем активације ендотелне NOS, смањујући фосфорилацију протеин киназе Акт (Hermann *et al*, 2000; Vasudevan and Garraway, 2010) и разградњом сигналне

рибонуклеинске киселине (mRNA) (Yoshizumi *et al*, 1993). TNF- $\alpha$  инхибира циклооксигеназу-1 (COX 1) који је важан ензим за очување нормалне ендотелне функције (Sattar *et al*, 2004). У РА синовија је богата адхезионим молекулима, због којих се накупљају леукоцити и изазивају инфламацију. Осим тога пронађен је висок ниво адхезионих молекула у циркулацији што је знак ендотелне активације. Интраћелијски адхезиони молекули, Е-селектин и Л-селектин су повећани у РА и у корелацији су са маркерима инфламације (Deesein *et al*, 2005) . Осим наведених путева у РА до ендотелне дисфункције долази и због атерогене дислипидемије и повећаног оксидативног стреса.

#### **1.1.3.1.4. Улога инфламације у коагулационом систему у РА**

Многе студије су показале да инфламација утиче на хиперкоагулабилност крви. Повећање TNF- $\alpha$  узрокује повећану експресију ткивног фактора на моноцитима и ендотелу што зпочиње коагулациону каскаду, депонујући тромбин и фибрин (Macías *et al*, 2005). TNF- $\alpha$  стимулише глатке мишићне ћелије у артеријама да продукују у већој количини екстраћелијски ткивни фактор и накупљање на оштећеним зидовима крвних судова (Ignegnoli *et al*, 2010). Чак и код пацијената са РА са ниском активношћу болести повећан је ниво фибриногена, фибрин Д-димера, ткивног плазминоген антиген активатора и Фон Вилебрандовог фактора (VWF) (McEntegart *et al*, 2001). Пацијенти са РА често испољавају патолошку тромбоцитопоезу (Ertenli *et al*, 2003). На основу тога може се рећи да пацијенти са РА имају хронично хиперкоагулабилно стање што је предиспозиција за артеријске тромбозе и инфаркт миокарда.

#### **1.1.3.2. Потенцијални не-инфламаторни механизми који повећавају КВ ризик у РА**

##### **1.1.3.2.1. КВ токсичност антиреуматских лекова**

###### **1.1.3.2.1.1. Кортикостероиди**

Познато је да глукокортикоиди изазивају повишен крвни притисак, хипергликемију, хиперхолестеролемију, хипертриглицеридемију и повећање телесне масе, што је све ризик за КВ болести (Moreland and O'Dell, 2002). У великој студији са РА, повећање КВ болести је регистровано код пацијента који су имали позитиван реуматоидни фактор и који су имали кумулативну дозу кортикостероида преко 7 грама са стопом морбидитета од 3.06 (Davis *et al*, 2007). Док су пацијенти који су имали негативан реуматоидни фактор без обзира на примену кортикостероида нису имали повећано КВ обољевање (стопа морбидитет 0.85). Објашњење за овај резултат је непознато. Са друге стране у студији где су парћени пацијенти са РА и већ присутном КВ болести у анамнези, кортикостеридна терапија је смањила ризик од КВ морталитета (Maradit-Kremers *et al*, 2005).

#### 1.1.3.2.1.2. Метотрексат

Многобројне студије су доказале да метотрексат смањује КВ обољевање и КВ морталитет, кроз ефекат смиривања активности болести (Choi *et al*, 2002; van Halm *et al*, 2006; Suisse *et al*, 2006). У великој студији пресека нађено је да пацијенти са РА који су употребљавали кортикостероиде и имуносупресиве (азатиоприн, циклосоприн, лефлуномид) чешће су оболевали од КВ болести (стопа морбидитета 1.5 и 1.8) у односу на пацијенте који су користили метотрексат (Solomon *et al*, 2006).

#### 1.1.3.2.1.3. Биолошка терапија

Лекови који антагонизују ефекат TNF- $\alpha$ , када су тестирани на почетку примене проузроковали су случајеве срчане слабости код РА пацијената (Kwon *et al*, 2003). Касније студије су доказале да ризик од срчане слабости није у вези са применом TNF- $\alpha$  антагониста у РА и да је чак мања инциденца појаве срчане слабости (Wolfe and Michaud, 2004). Две друге студије нису показале смањење инциденце инфаркта миокарда и срчане слабости код пацијента са РА третираних TNF- $\alpha$  антагонистима али је у групи где је смањена активност болести после лечења TNF- $\alpha$  антагонистима регистровано смањење броја КВ догађаја (Dixon *et*

*al*, 2007; Listing *et al*, 2008). Ови резултати указују да успешна супресија инфламације са TNF- $\alpha$  антагонистима надмашује потенцијални ризик од токсичности лека. Студија која је упређивала пацијенте који су користили TNF- $\alpha$  антагонисте и пацијенте који су користили монотерапију са метотрексатом, није показала разлику у појави КВ догађаја између те две групе (Solomon *et al*, 2006) .

#### **1.1.3.2.1.4. Нестероидни антиинфламаторни лекови**

Нестероидни антиинфламаторни лекови, посебно инхибитори циклооксигеназе 2 (COX-2) имају велики и комплексни утицај на појаву КВ догађаја. Сваки потенцијални антиинфламаторни бенефит је у сенци протромботског ефекта инхибиције COX-2 и кроз могућу нежељену интерреакцију са антиагрегационом терапијом (Recommendations for use of selective and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs, 2008). Сумарно, можемо рећи да упркос њиховој КВ токсичност, ефекат на смиривање запаљења је значајан у РА јер је у директној вези запаљење са развојем КВ болести.

#### **1.1.3.2.2. Генетски полиморфизам у РА повећава КВ ризик**

У популацији пацијената са РА немају сви КВ болети тако да се може претпоставити да генетска предиспозиција има улогу у настанку атеросклерозе. Студије су доказале да пацијенти са РА који имају HLA-DRB1\*0404 епитоп имају лошију ендотелну функцију, мерену методом протоком изазване вазодилатације брахијалне артерије (Gonzalez-Juanatey *et al*, 2003). Осим тога доказали су да је повећана стопа КВ морталитета у тој групи пацијената у односу на остеле пацијенте са РА (стопа морталитета је износила 6.65) (Gonzalez-Gay *et al*, 2007). Пацијенти са овим алелом су имали и тежи облик РА са високом активношћу болести, што је указивало на већи степен инфламације која је имала утицај на већи ризик од КВ обољевања.

## 1.2. ЕНДОТЕЛ

### 1.2.1. Хистолошке карактеристике ендотела

Унутрашњост срца, крвних и лимфних судова обложена је јединственим ћелијским омотачем који се назива ендотел. Овај назив је први употребио швајцарски анатом Wilhelm His 1865 године (Aird, 2007). У организму одрасле особе има 60 трилиона ендотелних ћелија, које покривају површину од око 750 квадратних метара и имају тежину око 1800г. Ендотел чини један слој пљоснатих многоугаоних ћелија, ширине 10 до 15 микрометара, дужине 25 до 50 микрометара, док дебљина ендотелних ћелија износи само 0,1 до 0,5 микрометара. Уздужна осовина ендотелних ћелија је оријентисана у правцу тока крви, што је нарочито изражено у деловима циркулације са брзим протоком, као што су артерије (Lačković i Vumbaširević, 2000). Унутрашња организација ендотелне ћелије је изразито поларизована, тј ћелија је подељена на апикални, латерални и базални одељак (Lačković i Vumbaširević, 2000). Апикални одељак је у непосредном контакту са крвљу, латералним одељцима ћелије се међусобно повезују, а базални одељак је у контакту са базалном мембраном и екстраваскуларним простором. Апикална површина ендотела је прекривена гликокаликсом који чине гликозаминогликани и сијалопротеини. Гликокаликс има важну улогу у рецепторски посредованом транспорту различитих молекула, као и у активацији низа сигналних каскада у ендотелним ћелијама (Schnitzer, 1993). На апикалном делу ћелијске мембране налазе се плазмалемалне везикуле, кавеоле, чија мембрана садржи рецепторе и друге протеине значајне у регулацији интрацелуларних процеса (Lačković i Vumbaširević, 2000). Поред кавеола, на апикалној мембрани су присутне и клатринске јамице и везикуле које омогућавају ендоцитозу макромолекула. У пределу латералног одељка ендотелних ћелија остварују се спојеви између суседних ћелија. Постоје три типа међућелијских спојева: тесне везе (tight junctions), адхерентне везе (adherens junctions) и комуникантне везе (gap junctions) (Dejana, 2004). Тесне везе су непермеабилни спојеви латералних мембрана ендотелних ћелија који настају међусобним чврстим спајањем

мембранских протеина, оклудина. Ови спојеви су кључни у одржавању селективне баријере између крви и ткива, јер спречавају дифузију свих молекула већих од 2 нанометра (Лаčković и Вумбаширевић, 2000). Адхерентне везе настају на местима где су ћелије повезане ћелијским адхезионим молекулима, кадхеринима, који су важни у контроли васкуларне пермеабилности за различите циркулишуће ћелије. Последњи тип међућелијских веза чине комуникантне везе, некуси, које представљају трансмембрански каналићи формирани од протеина конексина, чиме је омогућен директан пролаз јона и малих молекула између ћелија. Базални одељак ендотелне ћелије комуницира са базалном мембраном и екстраваскуларним простором. Ендотелне ћелије се повезују са базалном мембраном посредством протеина интегрина. Базална мембрана се састоји од нефибрилираног колагена тип 4, ламинина, фибронектина, хепарин-сулфат протеогликана и других протеина, а ту се налази и фонВилебрандов фактор. Испод базалне мембране налази се екстрацелуларни матрикс састављен од колагена типа 1, 2, 5 и 6, фибронектина и мноштва других гликопротеина и протеогликана (Лаčković и Вумбаширевић, 2000).

У централном делу ендотелних ћелија смештено је једно окружено органелама; Голџијев комплекс са бројним везикулама, лизозоми, гранулисани ендоплазматски ретикулум (нарочито развијен у стању активације ендотелних ћелија), рибозоми, полизоми и митохондрије. Ту су смештене и специфичне грануле познате као Weibel-Paladeова којима се налазе полимери von Willebrand-овог фактора (Лаčković и Вумбаширевић, 2000). Ендотелне ћелије су главни извор von Willebrand-овог фактора који се конситутивно секретује у плазму и екстрацелуларни матрикс (Denis, 2002). Међутим, у случају стимулације ендотела факторима као што је тромбин, настаје брзо излучивање von Willebrand-овог фактора, фузијом Weibel-Paladeова-их телашца са мембраном ћелија, што омогућава учешће von Willebrand-овог фактора у хемостази (van Mourik *et al*, 2002). Ендотел има веома развијен цитоскелет који чине микротубули, интермедијерни филаменти и микрофиламенти. Међу њима најизраженији су актински микрофиламенти, распоређени у три слоја: сипод апикалне ћелијске мембране, где чине субплазмалемалну мрежу, у латералном одељку, где су



повезани са међућелијским спојевима, и у виду „стрес влакана“ која се пружају дуж уздужне осовине ћелије. Стрес влакна се налазе само у ендотелу који је изложен већем механичком стресу, као што је ендотел артерија, артериола и венских залистака и имају улогу механичке потпоре (Lačković i Bumbaširević, 2000). Микрофиламенти и интермедијерни филаменти нису само микроструктурни протеини, већ учествују у регулацији физиолошких процеса у ендотелним ћелијама, омогућавајући интрацелуларни транспорт и груписање важних ензимских система.

Иако ендотел представља континуирани ћелијски слој који покрива унутрашњу површину срца, артерија, артериола, капилара, венула и вена, погрешно је сматрати да ендотелне ћелије у свим наведеним васкуларним подручјима имају нисте морфолошке и функционалне особине. Напротив, ендотел појединих сегмената васкуларног стабла показује изразиту хетерогеност, како у морфолошком, тако, још више, у функционалном погледу (Aird, 2007). Ова хетерогеност је последица специјализоване функције коју ендотелне ћелије имају у појединим васкуларним сегментима, а за кардиоваскуларни систем нарочито је значајна функција ендотела артерисјких крвних судова и срчаног ендокарда.

### **1.2.2. Физиолошка улога ендотела**

Ендотелне ћелије имају значајну аутокрину, паракрину и ендокрину улогу, што им омогућава да буду главни регулатори васкуларне хомеостазе. Аутокринна улога ендотела подразумева да бројни продукти ових ћелија делују на саме ендотелне ћелије, стимулишући или инхибишући одређене процесе. Паракрина улога ендотела остварује се кроз многоструке интеракције са ћелијама у крвној струји, првенствено са тромбоцитима и леукоцитима, као и са ћелијама у зиду крвног суда, нарочито са глатки мишићним ћерлијама. Ендокрину улогу има ендотел перитубуларних капилара бубрега, који луче хормон еритропоетин, важан за регулацију еритроцитопоезе у црвеној костној сржи.

Физиолошке функције ендотелних ћелија укључују:

- учествовање у формирању крвних судова (ангиогенези)
- омогућавање размене кисеоника, хранљивих супстанци и продуката метаболизма између крви и ткива
- учествовање у процесима коагулације и фибринолизе
- регулацију васкуларног тонуса
- антиинфламаторну и имуно-модулаторну улогу
- антипролиферативну улогу
- антиатеросклеротску улогу
- регулацију структуре

#### 1.2.2.1. Улога ендотелних ћелија у ангиогенези

Формирање функционалне мреже крвних судова је изузетно комплексан процес који укључује координисану активност више типова ћелија и зависи од њихове међусобне комуникације (Michiels, 2003). У физиолошким условима процес ангиогенезе се дешава током раста и развоја, као и приликом зарастања повреда, међутим овај процес се одиграва и у патолошким стањима као што је хипоксијом условљено формирање артеријских колатерала у срцу, неоангиогенеза у атеросклеротским плаковима или у туморском ткиву. Кључну улогу у ангиогенези имају ендотелне ћелије, односно фактори раста које оне продукују: васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), азот моноксид (NO), ангиопоетин и чланови фамилије ефрина (Michiels, 2003). Сматра се да је VEGF најзначајнији покретач ангиогенезе, неопходан да покрене формирање незрелих крвних судова стварањем ангиогених пупуљака од већ формираних крвних судова (Ferrara, 1999). VEGF стимулише ослобађање NO из ендотелних ћелија, а NO покреће биосинтезу

рецептора за VEGF (Hood *et al*, 1998). NO такође спречава ослобађање ангиостатина, који инхибише даљу ангиогенезу (Matsunaga *et al*, 2002). Ангиопоетин и ефрин касније омогућавају ремоделовање и матурацију новоформираних крвних судова насталих интеграцијом ендотелних пупољака са потпорним ћелијама, као што су глатке мишићне ћелије и перицити.

### 1.2.2.2. Транспортна улога ендотела

Ткивни капилари су места најинтензивније размене материја. Ендотел капилара појединих васкуларних подручја има специјализовану транспортну функцију, која је од изузетне важности за нормално функционисање појединих органа. Специјализованост функције може се најбоље демонстрирати примером крвно-мождане баријере, синусоидним капиларима јетре, или филтрационом мембраном у нефронима бубрега. Иако се транспортна улога ендотела повезује са ткивним капиларима, трансендотелна размена супстанци између крви и зида крвног суда дешава се у свим деловима циркулаторног система, доприносећи, у извесној мери, исхрани ћелија у зиду крвног суда. Мали молекули и јони се транспортују процесом дифузије, олакшане дифузије и активним транспортом, а макромолекули пролазе корз ендотелну баријеру трансцелуларним транспортом у везикулама (Aird, 2007; Bendayan, 2005). На овај начин у субендотелни простор артеријских крвних судова доспевају и супстанције које учествују у одређеним патолошким процесима, на пример липопротеинске партикуле мале густине (LDL) и завршни производи неензимске гликације код оболелелих од дијабетеса.

### 1.2.2.3. Улога ендотелних ћелија у процесима коагулације и фибринолизе

Ендотел крвних судова ствара бројне супстанције које су значајне за регулацију васкуларне хемостазе и функције тромбоцита. Неки од ових продуката имају прокоагулантну улогу и промовишу активацију, адхезију и агрегацију тромбоцита, док други остварују супротан, профибринолитички и антитромбоцитни ефекат (Табела 1 )

**Табела 1. Продукти ендотелних ћелија значајни у васкуларној хемостази**

Антикоагулантни и антитромбоцитни продукти ендотелних ћелија	Прокоагулантни продукти ендотелних ћелија
Азот-моноксид (NO)	Фактор активације тромбоцита (PAF)
Простациклин (PGI <sub>2</sub> )	Von Willebrandov faktor (vWF)
Ектонуклеотидазе (АТР-aze, АДР-aze)	Ткивни фактор (TF)
Тромбомодулин	Инхибитор активатора плазминогена (PAI-1)
Протеин Ц/протеин С	
Антитромбин III (АТ III)	
Хепарин кофактор II	
Хепарину слични гликозаминогликани инхибитор ткивног фактора раста	
Ткивни активатор плазминогена (t-PA)	

Здрав ендотел се карактерише балансом ових продуката у корист антикоагулантне и антитромбоцитне функције, међутим оштећење ендотела приликом повреде крвног суда, или услед излагања ендотелних ћелија слободним радикалима и проинфламаторним цитокинима, помера овај баланс ка прокоагулантном фенотипу (Pearson, 1999). Најзанчајнији антитромбоцитни чиниоци које ствара здрав ендотел јесу простациклин (PGI<sub>2</sub>) и NO (Cines et al, 1998). PGI<sub>2</sub> се ствара у ендотелним ћелијама посредством специфичног ензима простациклин-синтазе (Cines *et al*, 1998) PGI<sub>2</sub>, делујући преко свог рецептора на тромбоцитима, повећава садржај цикличног аденозин-монофосфата (сАМР), чиме се спречава активација, адхезија и агрегација тромбоцита, а могућа је и дезагрегација слбије повезаних крвних плочица. NO има комплементарну улогу са PGI<sub>2</sub> у погледу утицаја на тромбоците (de Graaf *et al*, 1992). PGI<sub>2</sub> и NO се конститутивно ослобађају из ендотелних ћелија, међутим њихова продукција се значајно повећава у случају стимулације ендотела супстанцијама укљученим у

коагулациони процес (нпр. тромбином), или супстанцијама које се ослобађају из активисаних тромбоцита (нпр. АТР-аза, АДР-аза), чиме се физиолошки омогућава ограничавање даљег формирања тромба. Поред  $\text{PGI}_2$  и  $\text{NO}$ , ендотел поседује и додатне механизме којима ограничава тромбоцитну активност. На површини ендотелних ћелија експримирају се ектонуклеотидазе (АТР-аза, АДР-аза) које хидролизују АТР и АДР, који су снажни стимулатори агрегације крвних плочица (Pearson *et al*, 1980). Поред  $\text{NO}$  који се ослобађа из ендотелних ћелија и инхибиторно делује на тромбоците и сами тромбоцити могу да стварају  $\text{NO}$  (Freedman *et al*, 1997). За разлику од ендотелних ћелија које конститутивно продукују  $\text{NO}$ , тромбоцити стварају  $\text{NO}$  само кад се активирају, чиме се активира и тромбоцитна азот-моноксид синтаза (која је истог подтипа као и ендотелна азот-моноксид синтаза) и започиње стварање  $\text{NO}$ , са синергистичким дејством са  $\text{NO}$  пореклом из ендотела (Freedman *et al*, 1997).

У физиолошким условима ендотелне ћелије олакшавају одржавање флуидности крви стварајући низ продуката са антикоагулантном активношћу. На површини ендотела присутан је тромбомодулин који олакшава активацију ендогеног антикоагулантног протеина Ц (Sadler, 1997). Активисан протеин Ц инактивноше факторе коагулације Va и VIIIa. Да би ово остварио, протеин Ц формира комплекс са протеином С, који стварају управо ендотелне ћелије (Esmon, 2000). Поред наведеног, тромбомодулин спречава активацију тромбина, а хепарију слични гликозаминогликани, хепарин кофактор II и антитромбин III, који се заједно са тромбомодулином налазе на површини ендотела, омогућавају инактивацију већ активисаног II фактора коагулације (тромбина), спречавајући настанак угрушка (Esmon, 2000). Ендотел синтетише и инхибитор ткивног фактора, а рецепторски посредованом ендцитозом, активисани X фактор се уклања из циркулације (Kato, 2002). Ендотел учествује и у процесу фибринолизе ослобађајући ткивни активатор плазминогена (t-РА) и урокиназу који претварају плазминоген у активан плазмин, што омогућава разградњу фибринских нити (Michiels, 2003).

Након активације ендотела повредом крвног суда, деловањем проинфламаторних цитокина или других чинилаца, долази до фенотипске промене ендотелних ћелија, која се огледа у повећаној продукцији прокоагулантних и протромботичних фактора и супресији антикоагулантних механизма (Gross and Aird, 2000). Постоје бар 2 чиниоца које ослобађају ендотелне ћелије, а који олакшавају активацију и агрегацију тромбоцита. Први је фактор активације тромбоцита (platelet activating factor, PAF), а други је фон Вилебрандов фактор (vWF) који се ослобађа из Вајбел-Паладеових (Weibel-Palad) телашца приликом деловања тромбина (van Mourik *et al*, 2002). vWF стабилизује VIII фактор коагулације и омогућава адхезију тромбоцита, стварајући мост између тромбоцитног рецептора GP Ib и колагена у субендотелном матриксу (Ruggeri and Preisner, 1999).

Активисане ендотелне ћелије стварају ткивни фактор и на њиховој мембрани експримира се рецептор за Ха фактор коагулације чиме се олакшава стварање тромбина, уз смањење активности протеина Ц и С и тромбомодулина (Chen *et al*, 2001). Истовремено, појачава се активност инхибитора ткивног активатора плазминогена (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), док се активност t-PA смањује (Sidelmann *et al*, 2000). Тромбин је врло моћан васкуларни чинилац, који осим про-коагулантне улоге (претварања фибриногена у фибрин), дејствује и као регулатор низа процеса у крвотоку и зиду крвног суда. Дејствујући на тромбоците условљавају њихову активацију, а дејство на ендотелне ћелије зависи од услова под којима се остварује. У физиолошким условима утицајем тромбина на ендотел појачавају се антитромбоцитни и антикоагулантни механизми којима се ограничава даље дејство крвног угрушка. Међутим, у случају удруженог деловања тромбина са проинфламаторним цитокинима, долази до даље трансформације фенотипа ендотелних ћелија, уз појачано ослобађање ткивног фактора, PAI-1, vWF, PAF-а, хемотаксичних цитокина, као и експримирање ћелијских адхезионих молекула, као што је П-селектин (Coughlin, 2000). Ове проинфламаторне и прокоагулантне промене фенотипа ендотелних ћелија одговарају развоју запаљенских процеса и олакшавају настанак васкуларне тромбозе, те се сматрају

кључним у иницијацији и напредовању процеса атеросклерозе зидова артеријских крвних судова.

#### 1.2.2.4. Улога ендотела у регулацији васкуларног тонуса

Улога ендотела у регулацији васкуларног тонуса остварује се ослобађањем различитих вазодилаторних и вазоконстрикторних супстани, као и модулацијом утицаја циркулишућих вазоактивних материја као што су ангиотензин, брадикинин, ацетилхолин, тромбин и други (Deanfield *et al*, 2007). Најзначајнији вазодилаторни продукт ендотелних ћелија је азот-моноксид (NO), а поред њега се ослобађају и PGI<sub>2</sub>, други вазодилаторни простагландини (PGE<sub>2</sub>), као и ендотелни хиперполаризујући фактор (endothelium-derived hyperpolarizing factor-EDHF).

Са изузетком NO, досадашња сазнања о улози других ендотелних вазодилатора у регулацији васкуларног тонуса су оскудна. Познато је да PGI<sub>2</sub> и други простагландини, могу изазвати ширење крвног суда, међутим њихова улога у регулацији васкуларног тонуса у људском организму доказана је само у специфичним васкуларним подручјима, као што је бубрежна микроциркулација (Schnitzer, 1993). Дејство PGI<sub>2</sub> је више интралуминално (превасходно на тромбоците) него аблуминално (на глатке мишићне ћелије), мада се не може искључити да PGI<sub>2</sub> доприноси регулацији васкуларног тонуса. Могуће је да постоји синергизам између NO и PGI<sub>2</sub>, или да PGI<sub>2</sub> преузима вазодилаторну улогу у стањима када је продукција NO компромитована.

Природа EDHF није у потпуности разјашњена, могуће је да је реч о факторима пореклом од цитохрома или о Ц-типу натриуретског пептида, а није искључено да постоји разлика у природи EDHF у различитим васкуларним подручјима (Halcox *et al*, 2001). EDHF повећава пропустљивост мембране глатких мишићних ћелија за јон калијума, узрокујући хиперполаризацију мембране и релаксацију глатких мишића у зиду крвног суда. Показано је да EDHF може да

компензује недостатак NO у одржавању васкуларног тонуса, нарочито у малим крвним судовима (Halcox *et al*, 2001).

Вазоконстрикторне супстанце које ствара ендотел јесу ендотелини (ET-1, ET-2, ET-3), вазоконстрикторни простагландини (PGF<sub>2</sub>alfa и PGH<sub>2</sub>) и ендотелни констрикторни фактор (endothelium-derived constricting factor, EDCF) (Michiels, 2003). Под утицајем агониста као што су тромбин, ангиотензин 2, адреналин и други, ендотелне ћелије синтетишу и ослобађају ендотелине који посредством ET $\alpha$  рецептора остварују дуготрајни вазоконстрикторни ефекат и стимулишу пролиферацију глатких мишићних ћелија (Kedzierski and Yanagisawa, 2001). Истовремено ендотелини делују и на саме ендотелне ћелије посредством ET $\beta$  рецептора, што омогућава да се у физиолошким условима, када је способност ендотелних ћелија да стварају NO очувана, повећа ослобађање NO и антагонизује деловање ендотелина (Michiels, 2003).

На површини ендотела функционише ангиотензин конвертујући ензим (ACE) који претвара неактивни ангиотензин I у ангиотензин II који има снажно вазоконстрикторно дејство и стимулише раст и пролиферацију глатких мишићних ћелија. Истовремено ангиотензин конвертујући ензим инактивира брадикинин, супстанцу са вазодилаторним и антиромботичним дејством.

Као што је претходно истакнуто на примеру ендотелина и NO, често је присутно истовремено ослобађање како вазодилаторних, тако и вазоконстрикторних продуката ендотела под утицајем истих агониста. Њихов ефекат на глатке мишиће зида крвног суда може бити синергистички, потенцирајући или антагонистички, тако да коначни васкуларни одговор настаје као резултат комплексних интеракција (Michiels, 2003). У том погледу посебно се издваја азот-моноксид, који не само да је главни вазодилаторни продукт ендотелних ћелија, већ има и кључну улогу у модулацији утицаја осталих ендотелних продуката на глатке мишићне ћелије. Узевши у обзир велики физиолошки значај азот-моноксида, у наредном делу ће бити детаљније описано порекло васкуларног азот-моноксида и физиолошки механизми у којима учествује.



#### 1.2.2.4.1. Азот моноксид - синтеза и физиолошка улога

Furchgott и Zawadzki су 1980.године објавили истраживање којим су показали да одговор зида крвног суда на стимулацију ацетилхолином зависи од присуства ендотела (Furchgott and Zawadzki, 1980). Приликом стимулације препарата аорте ацетилхолином вазодилатација је настајала само у случају када је ендотел очуван, док је у случају деловања ацетилхолином на препарат након уклањања ендотела настајао супротан одговор-вазоконстрикција. Закључено је да ацетилхолин делује посредно, ослобађајући из ендотела супстанцу са вазодилаторним дејством која је названа ендотелни релаксирајући фактор (endothelium-derived relaxing factor, EDRF). Природа EDRF је разјашњена тек 1987. године када су Moncada и Ignarro доказали да је EDRF заправо азот-моноксид, а 1992. године клониран је ген за ензим који у ендотелним ћелијама синтетише NO из L-arginina и тиме је отклоњена свака сумња да је тако једноставно једињење као што је NO, најважнији дилаторни продукт васкуларног ендотела (Palmer *et al*, 1987; Ignarro *et al*, 1987; Lamas *et al*, 1992). Индетификацијом NO као биолошки активне супстанце ендотелног порекла, отворено је ново поглавље у истраживањима физиолошких и патолошких процеса у кардиоваскуларном систему, што ће довести у наредним деценијама до великог унапређења сазнања о регулацији бројних кардиоваскуларних процеса, као и о настанку и развоју низа кардиоваскуларних и других обољења. Коначно признање научницима најзаслужнијим за расветљавање значаја NO за васкуларну биологију одато је 1998. године доделом Нобелове награде за физиологију и медицину Furchgott-у, Ignarro-у и Murad-у.

NO је гас и слободни радикал који има један неспарени електрон, те је биолошки живот NO кратак-свега десетак секунди (Bruckdorfer, 2005). Синтезу NO врши посебан ензим, азот-моноксид синтаза (NOS) (Bruckdorfer, 2005). У организму постоје 3 изоформе овог ензима. NOS I се налази у пресинаптичким нервним завршецима у централном и аутономну нервном систему, означава се и као неуронска NOS (nNOS) и ствара NO који делује као неуротрансмитер и модулатор

функције неуронаутономног и централног нервног система. NOS II или индуцибилна NOS (iNOS) се налази у полиморфонуклеарним леукоцитима и макрофагима (Bruckdorfer, 2005). iNOS постаје активна након фагоцитозе спољашњих патогена када омогућава продукцију велике количине NO и цитотоксично дејство на фагоцитиране микроорганизме. Трећа изоформа азот-моноксид синтазе је NOS III, која је прво идентификована у ендотелним ћелијама, те одатле потиче и други назив за овај ензима, ендотелна NOS (eNOS). Касније је показано да ова изоформа ензима азот-моноксид синтазе присутна и у кардиомиоцитима и тромбоцитима (Shaul, 2002; de Graaf *et al*, 1992). Активација eNOS је комплексан процес условљен, с једне стране, деловањем хемијских или физичкиц активатора, а с друге стране потенциран или атенуисан посттранслационим модификацијама ензима, као и присуством регулаторних протеина и кофактора неопходних за ензимску активност. eNOS се конститутивно експримира на ендотелним ћелијама и налази се везана за инвагинације ћелијске мембране, познатим као кавеоле. У ћелијској мембрани кавеола груписани су рецептори за различите агенсе који регулишу активност eNOS (Shaul, 2002; Bruckdorfer, 2005). eNOS је везана за структурни протеин мембране кавеола, кавеолин, који тонички инхибише eNOS, блокирањем протока сигнала од рецептора до eNOS и спречавањем везивања калмодулина за eNOS (Michel *et al*, 1997). Агонисти као што су ацетилхолин, брадикинин, хистамин, естрадиол, и други, активишу eNOS везујући се за рецепторе смештене у мембрани кавеола. Везивањем за рецепторе долази до активације сигналне каскаде која укључује Г регулаторни протеин и фосфолипазу Ц, чиме је омогућено стварање других гласника, инозитол 3-фосфата и диацилглицерола (Loscalzo and Welch, 1995). Инозитол 3-фосфат ослобађа калцијумове јоне из интрацелуларних депоа, а пораст интрацелуларне концентрације калцијума омогућава стварање комплекса са калмодулином који активише eNOS, ослобађајући eNOS од кавеолина (Bruckdorfer, 2005). Агонисти који делују преко мембранских рецептора могу да активишу и ензиме из групе протеин киназа као што су АМР-зависна протеин киназа, протеин киназа С, Акт протеин киназа, сАМР-зависна протеин киназа и друге, што доводи до фосфорилације аминокиселине серин на специфичној позицији у молекулу

eNOS (Shaul, 2002). Ова модификација eNOS олакшава активацију ензима и појачава ензимску активност, чак и при ниским интрацелуларним концентрацијама калцијума.

Поред активације eNOS рецепторски посредством деловањем агониста, одређени физички фактори, као што је тангенцијална сила смицања (shear stress) коју врши крвна струја, или промена парцијалног притиска кисеоника у крви, могу активирати eNOS независно од повећања интрацелуларне концентрације калцијумових јона (Shaul, 2002). Под утицајем тангенцијалне силе смицања долази до отварања калцијумских јонских канала на мембрани ендотелне ћелије и фосфорилације тирозинских аминокиселина у молекулу eNOS посредством специфичних тирозин-киназа, што омогућава активацију ензима чак и при ниској интрацелуларној концентрацији јона калцијума (Shaul, 2002).

eNOS се састоји од два домена, оксигеназног и редуктазног, који имају посебну ензимску активност (Bruckdorfer, 2005). За оксигеназни домен се везују важни кофактори, хем и тетрахидробиопротеин (BH<sub>4</sub>). За редуктазни домен се везују кофактори флавинаденин динуклеотид (FAD), флавин мононуклеотид (FMN) и никотин-аденин динуклеотид фосфат (NADPH) (Bruckdorfer, 2005). Два домена повезује калмодулин, а када се за калмодулин вежу калцијумови јони, у присуству посебног регулаторног протеина hsp90 (heat shock protein 90), дислоцира се инхибиторни кавеолин и отпочиње проток електрона између два домена eNOS (Bruckdorfer, 2005). Тиме је омогућено да се из аминокиселине L-аргинина издвоје NO и L-цитрулин, из кога касније може да се регенерише L-аргинин.

Делимична инактивација eNOS настаје интернализацијом ензима у унутрашњост ћелије, што онемогућава стварање калцијум-калмодулин комплекса, јер се ова реакција одиграва само у субплазмалемалном одељку ћелије. Инактивација је додатно потпомогнута дефосфорилацијом кључних регулаторних места у ензиму или фосфорилацијом инхибиторних места (Drudzinski and Michel, 2007). Интернализована eNOS има извесну ензимску активност, значајно слабију од eNOS везане за ћелијску мембрану. Значај ензимске активности и механизми

регулације интернализоване eNOS још увек нису у потпуности разјашњени, мада је могуће да у регулацији учествују посебни регулаторни системи који укључују редокс стање ћелије (глутатион, каталезе), метаболизам холестерола (HMG-Co синтаза), енергетски метаболизам ћелије, као и eNOS-асоциране протеине (NOSIP) (Drudzinski and Michel, 2007).

NO настао активношћу eNOS дифундује до ћелија васкуларног глатког мишића где активира солубилну гуанилилциклазу (sGC) (Мијовић, 2007). Везивањем NO за sGC базална активност овог ензима повећава се 200 пута (Bruckdorfer, 2005). Повећањем активности sGC повећава се концентрација интрацелуларног другог гласника cGMP-а, који активира протеин киназу зависну од cGMP-а (протеин киназа G). Она врши фосфорилацију киназе лаког ланца миозина, чиме се спречава стварање попречних мостова између актина и миозина у глатком мишићу (Мијовић, 2007). Истовремено се одиграва и фосфорилација калцијумске пумпе на саркоплазматском ретикулуму и смањује интрацелуларна концентрација калцијумових јона, а крајњи резултат је релаксација глатке мишићне ћелије, односно вазодилатација артерије.

NO је најзначајнији у регулацији васкуларног тонуса у артеријском делу васкуларног стабла, посебно у великим артеријама еластичног типа, или већим артеријама мишићног типа, које су главни кондуктивни крвни судови, који омогућавају допремање довољне количине крви до метаболички активних органа или мишића (нпр. коронарне, реналне, брахијалне, феморалне артерије). NO је важан за регулацију васкуларног тонуса, као у базалним условима, тако и условима повећаних потреба за протоком крви. Базална продукција NO у ендотелним ћелијама артерија се одржава захваљујући сталном пулсатилном току крвне струје. Међутим, у условима значајног повећања протока (shear stress-а) због метаболички изазване вазодилатације мањих артерија органа и мишића, као и приликом деловања агониста, настаје додатно повећање ензимске активности eNOS и продукције NO, што обезбеђује да се краће или дуже време одржи адекватна

вазодилатација крвог суда. На овај начин ендотел омогућава регулацију артеријског тонууса која је адекватна потребама за протоком крви.

#### 1.2.2.5. Улога ендотела у регулацији структуре кардиоваскуларног система

Ендотелне ћелије облажу луминалну страну крвних судова (и артеријских и венских), срчаних шупљина (ендокардни ендотел), као и лимфних судова. Сматра се да током ембриогенезе долази до диференцијације ембрионалне васкулатуре зависно од паренхимског органа који исхрањује, а у интерреакцији и међузависности са глатким мишићним ћелијама које воде порекло од одговарајућег органа (Ross, 1997). Нормални артеријски судови се састоје од три слоја: *Tunica intima*, *Tunica media* и *Tunica adventitia*. Интима је први луминални слој који се састоји од слоја ендотелних ћелија на базалној мембрани, међусобно спојених чврстим („tight junction“) и лабавим везама („gap junction“). Испод базалне мембране је субендотелни слој, који је у ствари продукт лучења ендотелних ћелија интима и глатких мишићних ћелија медије и најбољи је показатељ захваћености крвних судова патолошким процесом (атеросклероза) (Ross, 1997). Гранична зона према медији је *lamina elastica interna* и у физиолошким условима она представља баријеру изнад које не мигрирају глатке мишићне ћелије. Спирално постављене глатке мишићне ћелије су најважнији супстрат мускуларних артерија, док су то еластичне ламеле код еластичног типа артерија. Свака еластична ламела има еластичне ламине унутра и споља од слоја ламинарно постављених глатких мишићних ћелија; када је више од 29 ламеларних јединица присутно неопходна је нутриција путем *vasa vasorum* (Ross, 1997). *Lamina elastica externa* је граница *Tunica media* и *adventitiae*, која је богата нутритивном васкулатуром (Ross, 1997).

Структура крвог суда је условљена ембриогенезом, хемодинамским силама које владају у крвном суду (центрипеталне, ламинарне и силе смицања), хуморалним саставом крви (концентрација оксидованог ЛДЛ холестерола, хомоцистеина, токсини, вируси, имунолошки фактори), као и локалним аутокидима насталим у васкуларном ендотелу, као одговор на разне стимулусе (Avolio, 1995). Ово је изразито динамични процес који траје практично током целог

људског века, а структура крвног суда је непосредни или чешће одложени одговор васкулатуре на хемодинамске силе и састав крви (Војић, 1995). Поред генетски условљених утицаја на васкуларну структуру (у које спадају и расни) значајни су и променљиви фактори (артеријски притисак, брзина пулног таласа, унос соли) (Avolio, 1995). Добро позната измена структуре крвног суда током атерогенезе је само једна, али најзначајнија модификација. Мање познате су измене структуре у смислу ремоделовања (концентрично распоређивање глатких мишићних ћелија у нормотензивним условима), концентричне хипертрофије (концентрично увећање масе глатких мишићних ћелија у хипертензивним условима) или ексцентричне хипертрофије (ексцентрично увећање масе глатких мишићних ћелија) (Ross, 1997).

Кључна функција ендотела у регулацији структуре крвног суда настаје као одговор ендотела на два истовремено и међусобно зависна утицаја: хемодинамске силе пулсатилног тока крви („shear stress“) и хуморални агенси циркулишуће течности (Avolio, 1995). Акутно дејство сила смицања се огледа кроз ендотел-зависне вазодилатације или миогени одговор зависно од нивоа ових сила, а хронични утицај се манифестује као васкуларно ремоделовање, који је први описао Mulvanу 1993. године. Сматра се да повећање сила смицања дуже од 60 секунди доводи до преструктурирања цитоскелета, дуже од једног сата до реорганизовања органела, а дуже од 6 часова до повећања механичке крутости, реорганизације ћелијске површине и смањене продукције тромбомодулина и фибронектина (Born, 1997). Ендотел у таквим условима модулише продукцију и ослобађање мноштва паракриних фактора укључујући NO, тромбоцитни зависни фактор раста-бета, трансформишући фактор раста бета-1, ткивни активатор плазминогена, простаглицин, ендотелин-1. У експериметима на анималним моделима Langille и O'Donnell (1991) су доказали да дуготрајно повећање протока кроз каротидну артерију пацова доводи не само до повећања њеног дијаметра, већ и до значајних структурних промена (Born, 1997).

У исто време хуморални агенси циркулишуће крви (ЛДЛ холестерол, токсини, вируси, имунолошки медијатори и др.) стимулишу у ендотелној ћелији

појачану продукцију и ослобађање фактора раста (PDGF-beta, TGF-beta1, bFGF) који на популацији глатких мишићних ћелија изазивају већу заступљеност синтетичког (секреторног) фенотипа у односу на контрактилни. Глатке мишићне ћелије секреторног фенотипа богатије су ендоплазматским ретикулумом и Голџи комплексом и продукују и ослобађају секреторне протеине и макромолекуле екстрацелуларног матрикса, који имају запажену улогу како у процесима васкуларног ремоделовања, хипертрофије, тако и у атерогенези (Ross, 1997).

#### **1.2.2.6. Улога ендотела у инфламацији и модулацији имунолошког одговора**

Ендотелне ћелије у стању мировања на својој луминалној мембрани не експримирају адхезионе молекуле, неопходне за причвршћивање и миграцију запаљенских ћелија. Здрав ендотел не продукује хемотаксичне цитокине који су неопходни за активацију леукоцита, а продукти здравог ендотела, NO и PGI<sub>2</sub>, имају антиадхезиони ефекат, спречавају активацију и агрегацију тромбоцита и инхибишу пролиферацију моноклеарних леукоцита у зиду крвног суда.

Ендотелне ћелије у посебним условима постају активни учесници инфламаторног процеса. Улога ендотела у инфламацији је саставни део физиолошког одговора организма на повреду или инфекцију и у овим процесима учествују ендотелне ћелије артериола, капилара и посткапиларних венула (Michiels, 2003). Ендотелне ћелије тада мењају свој фенотип под утицајем проинфламаторних цитокина и продијеката микроорганизама, који се ослобађају са места повреде или инфекције и иницирају процес запаљења (Muller, 2003)

Међутим, под утицајем различитих штетних чинилаца у крвној струји (хиперхолестролемија, хипергликемија и др.) деловањем ендогених фактора који нарушавају нормалну ендотелну функцију (ангиотензин II, Ц реактивни протеин и др.) и утицајем проинфламаторних цитокина ослобођених из зида крвног суда, ендотел великих артерија еластичног и мишићног типа подлеже трансформацији у проинфламаторни и протромботични фенотип и активно суделује у

инфламаторном процесу у интими крвних судова, стварајући патофизиолошку основу атеросклерозе (Muller, 2003)

Миграција полиморфонуклеарних леукоцита на место запаљења у случају инфекције, или миграција моноцита и лимфоцита на место инфламације у атеросклеротском плаку у интими артеријског крвног суда, у основи имају исте физиолошке механизме, али се разликују по типу молекула који се експримирају на ендотелним ћелијама и врсти леукоцита који мигрирају кроз ендотел (Springer, 1994).

Пролаз леукоцита кроз ендотел захтева препознавање места на коме ће се адхерисати и остваривање чврстих веза са ендотелним ћелијама, што је могуће само ако је ендотел „активиран“, односно уколико испољава проинфламаторни фенотип. Активирани ендотел на својој луминалној мембрани експримира одређене адхезионе молекуле и продукује хемотаксичне цитокине (хемокине) који привлаче леукоците (Wagner *et al*, 2000). Адхезиони молекули на мембрани ендотела припадају фамилији селектина и имуноглобулина (McEver *et al*, 1989). Леукоцити из крвне струје препознају место на ендотелу за које се могу адхерисати захваљујући интеракцији леукоцитног молекула L-selektina са ендотелним адхезионим молекулима, Е-селектином и П-селектином (McEver *et al*, 1989). Причвршћавање леукоцита за ендотел интеракцијом са селектинима омогућава њихово „котрљање“ и активацију хемокина (Rollins *et al*, 1997). Хемокини одређују тип леукоцита који ће бити активиран и који ће даље мигрирати кроз ендотелне ћелије. У случају инфламације у атеросклеротском плаку долази до продукције хемокина као што је моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (MCP-1) који је специфичан за мононуклеарне леукоците (Nickel *et al*, 1999). Након активације, леукоцити се чврсто везују за ендотел посредством имуноглобулинске фамилије адхезионих молекула на ендотелним ћелијама – интерцелуларне адхезионе молекуле 1 и 2 (ICAM 1 ICAM 2) васкуларни адхезиони молекул 1 (VCAM-1) (Klein *et al*, 1995). Након чврстог везивања за површину ендотела, леукоцити мигрирају до међућелијских спојева ендотелних ћелија и провлаче се



кроз те спојеве. Ово је омогућено ретракцијом активисаних ендотелних ћелија и раскидањем чврстих међућелијских веза, чиме је олакшана миграција леукоцита (Su *et al*, 2005).

Миграција леукоцита на место инфламације у случају повреде или инфекције је самоограничавајући процес који омогућава уклањање штетног агенса, репарацију ткива и успостављање физиолошког стања. Међутим, у случају развоја атеросклеротског плака, инфламаторни процес је хроничног и прогресивног карактера.

### 1.2.2.7. Антиатеросклеротска улога ендотела

Атеросклероза је хронично инфламаторно обољење интима великих еластичних артерија и артерија мишићног типа. Кључну улогу у овом процесу има ендотелна дисфункција која се огледа у проинфламаторној и протромботичној трансформацији ендотелних ћелија. Здрав ендотел је мање пропустан за липопротеине мале густине, чиме је смањена вероватноћа њиховог продора у интиму крвног суда, што је иницијални догађај у настанку атеросклерозе. Ендотел који нормално функционише не ствара слободне кисеоничне радикале који су одговорни за липидну пероксидацију липопротеина мале густине у интими крвног суда. Липидна пероксидација је врло значајан догађај у раној атеросклерози јер омогућава дуже задржавање пероксидисаних липидних партикула у интими артерија, њихово препознавање и фагоцитозу посредством посебних рецептора на инфламаторним ћелијама, као и антигену активацију Т лимфоцита. Адхезија леукоцита и миграција у интиму артерија је још један кључни догађај у раној атеросклерози. Међутим продукти здравог ендотела, на првом месту NO, имају антиадхезиони учинак на леукоците (Zeiger *et al*, 1995) и супримирају испољавање гена за адхезионе молекуле на мембрани ендотела, спречавајући продор инфламаторних ћелија (Forsterman *et al*, 2006). Поред тога NO инхибише миграцију и пролиферацију глатких мишићних ћелија, неопходну за настанак атеросклеротског плака (Forsterman *et al*, 2006).

Не само да здрав ендотел штити од настанка атеросклерозе, већ има улогу и у протекцији од даље прогресије овог патолошког процеса, као и од настанка компликација атеросклерозе. NO спречава ослобађање проинфламаторних цитокина и фактора раста који омогућавају повећање броја инфламаторних ћелија у атерому, као и ензима који деградирају колагена и еластична влакна у фиброзној капи већ формираног плака. На овај начин се спречава даље накупљање леукоцита у плаку и његов раст, а промовише се стварање дебље фиброзне капе, што је предуслов за настанак стабилног плака са мањом склоношћу ка руптури и тромбози. NO и PGI<sub>2</sub> спречавају адхезију и активацију тромбоцита, ослобађање митогена из активисаних тромбоцита, као и настанак тромботичних компликација. У целини посматрано, може се сматрати да је NO најзначајнији васкуларни антиатеросклеротски фактор (Forsterman *et al*, 2006).

### 1.2.3. Ендотелна дисфункција

Појам ендотелне дисфункције се односи на смањено стварање и/или ослобађање NO, поремећену вазорегулаторну улогу, задобијање проинфламаторних и протромботичних својстава ендотелних ћелија и поремећај у регулацији васкуларног раста и ремоделовања (Cai and Harrison, 2000). Бројне студије су доказале да изложеност традиционалним факторима ризика за атеросклерозу доводи до појаве ендотелне дисфункције. Заједнички механизам који фактори ризика узрокују ендотелну дисфункцију јесте повећање оксидативног стреса и стварање проинфламаторног стања. КВ фактори ризика активирају експресију про-оксидативних гена у ћелијама зидова крвних судова, повећавају стварање слободних кисеоничних радикала и активирају локални систем ренин-ангиотензин, доводећи до ослобађања фактора раста, проинфламаторних цитокина, хемотаксина и адхезионих молекула на ендотелним ћелијама (Chatzizisis *et al*, 2007). Ова комплексна каскада карактерише транзицију од нормалне ендотелне функције, ка ендотелној дисфункцији, а ендотелна дисфункција је важан патогенетски чинилац у настанку и прогресији бројних кардиоваскуларних обољења (Chatzizisis *et al*, 2007).

### 1.2.3.1. Значај тангенсијалне силе смицања крвне струје (shear stress-a) за настанак ендотелне дисфункције

Прве атеросклеротске лезије се формирају већ у раном детињству на специфичним местима у циркулацији као што су артерије са великим бројем побочних грана (предња десцедентна коронарна артерија), или артеријске рачве (аорта, каротидне и илијачне артерије). Поред раног настанка, ове лезије имају тенденцију брже прогресије и чешће појаве компликација у виду руптуре плака и тромбозе (Chatzizisis *et al*, 2007). Артерије правог тока са малим бројем побочних грана (брахијална или унутрашња мамарна артерије) су релативно поштеђене од настанка атеросклерозеа уколико се и формирају плакови чешће имају карактеристике стабилних атеросклеротских плочица које се ретко компликују тромбозом (Chatzizisis *et al*, 2007). Узевши у обзир да класични фактори ризика за атеросклерозу делују системски на целокупно васкуларно стабло, тешко је објаснити због чега атеросклероза показује предилекцију за одређене сегменте артеријског стабла. Такође, тешко је објаснити настанак првих атеросклеротских лезија још у најранијем детињству када изложеност факторима ризика или не постоји или је врло кратка, укључујући и интраутерини период.

Разјашњење ових недоумица проистекло је из истраживања која су показала да на местима раног развоја атеросклерозе долази до неповољног утицаја локалних хемодинамских чинилаца, у виду нарушавања нормалног ламинарног тока крви и појаве турбуленције, што неповољно утиче на тангенсијалну силу смицања (shear stress) којем крвна струја делује на васкуларни ендотел, узрокујући рани настанак ендотелне дисфункције, као прве етапе у развоју атеросклерозе (Chatzizisis *et al*, 2007). Даља истраживања су потврдила фундаментални значај тангенсијалне силе смицања, како за нормалну ендотелну функцију, тако и за дисфункцију артеријског ендотела и настанак атеросклерозе (Stone *et al*, 2007).

Тангенсијалне силе смицања настају услед фриkcије крвне струје о површину ендотела и изражава се јединицама силе по површини ( $N/m^2=Pa$ ) (Slager *et al*, 2005). На тангенсијалну силу смицања утиче вискозност крви, као и карактеристике тока

крви. У релативно правим сегментима артеријског стабла, под условом да нема интралуминалних сужења, ток крви је ламинаран и тангенсијална сила смицања има пулсатилни карактер (Chatzizisis *et al*, 2007). То значи да је shear stress једносмеран, његова величина умерено варира, зависно од фазе срчног циклуса, а средња вредност shear stress-а је високо позитивна од 1,5 до 7 Pa. Овакав shear stress је физиолошки врло повољан јер повећава експресију гена за eNOS и потенцира активност eNOS преко фосфорилације овог ензима, чиме се повећава способност ендотелних ћелија да стварају NO. Може се рећи да је пулсатилни shear stress најважнији физиолошки стимулус за стварање и ослобађање NO од стране здравог ендотела (Naseem *et al*, 2005).

У сегментима артеријског стабла где постоје артеријске бифуркације или одвајање побочних грана, долази до поремећаја тока крви, тако да настаје турбулентни ток, који ствара ослабљени пулсатилни или осцилаторни shear stress. Исто се дешава и на местима интралуминалних артеријских сужења узрокованих атеросклеротским плаковима. Ослабљени пулсатилни shear stress је једносмеран са ослабљеном амплитудом током срчаног циклуса, а средња вредност тангенсијалне силе смицања је значајно смањена (мања од 1 Pa) (Chatzizisis *et al*, 2007). Осцилаторни shear stress је бидирекциони и има врло варијабилну амплитуду током срчаног циклуса, тако да је средња вредност тангенсијалне силе смицања врло ниска, близу 0 Pa (Chatzizisis *et al*, 2007). Ослабљени пулсатилни и осцилаторни shear stress имају неповољни утицај на ендотелну функцију и олакшавају настанак атеросклерозе у артеријском зиду преко више механизма:

- смањењем транскрипције и транслације гена за eNOS (Lam *et al*, 2006 ),
- смањењем продукције простацилина и повећањем продукције ендотелина-1 (Malek *et al*, 1999 ),
- повећањем експресије гена за рецептор за липопротеине мале густине, као и ензиме који врше синтезу холестерола и масних киселина у ендотелним ћелијама (Malek *et al*, 1999),

- промене облика ендотелних ћелија и повећање пропустљивости услед проширивања међућелијских спојева, чиме се олакшава продор липопротеина и леукоцита у субендотелни простор (Liu *et al*, 2002),
- повећање експресије гена за ензиме као што је NADPH оксидаза, који повећавају оксидативни стрес, и смањењем експресије гена за ензиме значајне за неутрализацију слободних кисеоничних радикала, као што је супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза (McNally *et al*, 2003),
- стварањем проинфламаторног стања. Ослабљени и осцилаторни shear stress и слободни кисеонични радикали индукују активацију транскрипционих фактора, као што је нуклеарни фактор-капа бета (NF-κB). NF-κB смањује експресију гена за eNOS, а повећава експресију гена за адхезионе молекуле на мембрани ендотелних ћелија (VCAIM-1, ICAM-1, E-селектин), хемотаксичне цитокине (MCP-1) и проинфламаторне цитокине (TNF-alfa, IL-1, IFN gamma). На овај начин се олакшава адхезија и миграција леукоцита у интиму крвног суда и промовише настанак атероклеротског плака (Mohan *et al*, 2003 ),
- повећањем ендотелне продукције фактора раста за глатке мишићне ћелије, међу којима су најважнији васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), ендотелин-1 и тромбоцитни фактор раста (PDGF) (Mohan *et al*, 2003),
- повећањем експресије гена за матриксне металопроотеиназе (MMP) које врше деградацију колагених и еластичних влакана у фиброзној капи већ формираног плака. MMP поред ендотелних ћелија продукују и друге ћелије присутне у плаку. као што су макрофаги, Т лимфоцити и мастоцити (Magid *et al*, 2003),
- индукцијом протромботичног и прокоагулантног стања. Смањењем стварања NO и PGI<sub>2</sub>, повећавају склоност тромбоцита ка адхезији и активацији. Поред тога, долази и до смањења експерсије ткивног

активатора плазминогена (t-PA), чиме се слабе природне фибринолитичке снаге. Узевши у обзир и промењене карактеристике тока крви, стварају се услови за олакшану активацију коагулационе каскаде (Chatzizisis *et al*, 2007).

Ослабљена или осцилаторна сила смицања је врло моћан локални стимулус за појаву ендотелне дисфункције и развој атеросклерозе, као и прогресију атеросклеротичних промена ка вулнерабилним, виско ризичним лезијама. Међутим, ни један чинилац сам по себи није довољан да узрокује и одржи развој патолошког процеса. Иако не можемо кориговати неповољне хемодинамске факторе који стварају предилекцију за ендотелну дисфункцију и атеросклерозу, можемо их значајно ублажити утицајем на друге факторе ризика, подложне модификацији.

### 1.2.3.2. Значај оксидативног стреса за настанак ендотелне дисфункције

Оксидативни стрес означава повећану продукцију реактивних кисеоничких врста у биолошком систему. Слободни кисеонични радикали имају неспарен електрон у спољној орбитали што их чини веома реактивним. Најважнији међу њима су NO, супероксид ( $O_2^-$ ), хидроксил радикал ( $HO^\cdot$ ), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) и пероксинитрит ( $ONOO^\cdot$ ) (Cai and Harrison, 2000). У физиолошким условима стварање слободних радикала је строго контролисано, а њихово потенцијално цитотоксично дејство спречавају антиоксиданти ензими као што је супероксид-дисмутаза или глутатион пероксидаза (Jakovljević *i sar*, 2011). Поједини слободни радикали имају важне физиолошке улоге. NO учествује у васкуларној хемостази, а други слободни радикали учествују у интрацелуларном преносу сигнала и модулацији ћелијских процеса, где посебна важност има регулација генске експресије (Griendling and Fitzgerald, 2003). Међутим, неконтролисана, прекомерна продукција слободних радикала може изазвати тешко ћелијско оштећење које се, у извесним случајевима, завршава смрћу ћелије (Djurić *i sar*, 2006).

Најзначајнији ензими који стварају слободне радикале су компоненте респираторног ланца митохондрија, липооксигеназа и циклооксигеназа, систем цитохрома P450, а у настанку ендотелне дисфункције посебан значај имају NADPH оксидаза, ксантин оксидаза и eNOS (Cai and Harrison, 2000).

NADPH оксидаза ствара веома реактиван слободни радикал кисеоника, супероксид анјон ( $O_2^-$ ). Активност NADPH оксидаза се значајно повећава у условима хиперхолестеролемије и хипергликемије, као и стимулације ендотелних ћелија ангиотензином 2, тромбином и тромбоцитним фактором раста (Cai and Harrison, 2000). Нормалан пулсатилни ток крви краткотрајно повећава стварање  $O_2^-$ , док ослабљени пулсатилни или осцилаторни ток крви доводи до дуготрајног повећања активности NADPH оксидаза и повећане експресије гена за овај ензим. Ксантин оксидаза ствара  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . Проинфламаторни цитокини повећавају активност ксантин оксидазе у ендотелним ћелијама (Dupont *et al*, 1992).

Посебан значај за настанак оксидативног стреса у ендотелним ћелијама има eNOS. Недостатак супстрата eNOS, L-аргинина, као и недостатак ензимског кофактора тетрахидробиоптерина ( $BH_4$ ), представљају познате патолошке ситуације у којима eNOS престаје да ствара NO и почиње да продукује  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ . Овај феномен означава се као раздвајање оксидо-редуктазне функције eNOS (eNOS uncoupling) и доказан је у низу патофизиолошких стања (Cai, 2000). Концентрација L-аргинина, у плазми је 48-140  $\mu\text{mol/L}$ , а у ендотелним ћелијама 600 до 900  $\mu\text{mol/L}$ , што значајно премашује ензимску константу ( $K_m$ ) eNOS за метаболизам L-аргинина (Cunober *et al*, 2002). Закључило би се да недостатак L-аргинина не може бити узрок ендотелне дисфункције, међутим у патофизиолошким стањима настаје компетитивна инхибиција ензима коју врше аналози L-аргинина, као што је асиметрични диметиларгинин (ADMA). ADMA настаје метаболизмом протеина под утицајем ензима протеин-аргинин метилтрансферазе, а из организма се елиминише урином или дејством ензима диметиларгинин

диметиламинохидролазе (DDAH) који претварају ADMA-у у L-цитрулин (Endemann *et al*, 2004). Хиперхолестеролемија, инсулинска резистенција и дијабетес, хиперхомоцистеинемија (Djuric *i sar*, 2008), хипертензија, пушење, осцилаторни shear stress повећавају стварање ADMA-е, преко инхибиције ензима за разградњу ADMA-е. Компетицијом са L-аргинином, ADMA не само да смањује продукцију NO од стране eNOS, већ условљава раздвајање оксидо-редуктазне функције ензима, тако да се омогућава синтеза слободних радикала кисеоника (Cai and Harrison, 2000).

Други механизми, којима настаје раздвајање ензимске функције eNOS је недостатак  $\text{BH}_4$  (Cai and Harrison, 2000). Недостатак  $\text{BH}_4$  може бити последица урођеног генетског дефицита или оксидације  $\text{BH}_4$  у дихидробиоптерин ( $\text{BH}_2$ ) услед повећане продукције  $\text{O}_2^-$  од стране NADPH оксидаза (Canaveri *et al*, 1999).

Раздвајање оксидо-редуктазне функције eNOS доприноси оксидативном стресу ендотелних ћелија на 3 начина:

- 1) смањује стварање NO, што онемогућава „детоксикацију“ слободних радикала коју NO врши у физиолошким условима, стварајући мање реактивне и мање штетне продукте (Cai and Harrison, 2000).
- 2) У случају потпуног раздвајања оксидо-редуктазне функције, eNOS постаје ензим који искључиво ствара слободне кисеоничне радикале
- 3) У случају делимичног раздвајања ензимске функције настају и NO и  $\text{O}_2^-$ . Тиме се стичу услови за њихово међусобно реаговање и настанак пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), веома реактивног слободног радикала, који може да врши оксидацију различитих протеинских или липидних структура у ћелији, мењајући њихову функцију. Између осталог повећава активност NF- $\kappa$ B и повећава експерсију гена за адхезионе молекуле и хемотаксичне цитокине (Griendling and Fitzgerald, 2003). Након дифузије кроз ћелијску



мембрану,  $\text{ONOO}^-$  доприноси пероксидацији LDL-а и потенцира настанак атеросклерозе (Milsten *et al*, 1999).

Повећани оксидативни стрес изазива ендотелну дисфункцију смањујући биолошку расположивост NO и доприноси трансформацији ендотелних ћелија ка прокоагулантном, протромботичном и проинфламаторном фенотипу. Феномен повећаног оксидативног стреса чини патофизиолошку основу многих обољења, укључујући хиперхолестеролемију, хипертензију, дијабетес, атеросклерозу и срчану инсуфицијенцију (Cai and Harrison, 2000). Покушаји да се оксидативни стрес превенира или лечи применом антиоксидантних витамина нису дали очекиване резултате (Griendling and Fitzgerald, 2003). Могуће је да антиоксидантни витамини у систему изложеном прекомерној продукцији слободних радикала и сами постају про-оксиданти (Upston *et al*, 2002). Могуће је да недовољна ефикасност у спречавању настанка слободних радикала потиче од немогућности да се на критичним местима, у ћелијама и ткивима изложеним оксидативном стресу, постигне адекватна концентрација ових једињења. Даље истраживање ензимских система који учествују у оксидативном стресу ће сигурно допринети ефикаснијој борби против овог важног патофизиолошког процеса (Jakovljevic *i sar*, 2011; Jakovljevic *i sar*, 2006 ).

#### 1.2.4. Испитивање ендотелне функције

Постоје различите методе за процену ендотелне функције, које се могу сврстати у две групе. Прва група метода се заснива на одређивању циркулишућих маркера које нормално ослобађа здрав ендотел, или се појачано ослобађају након оштећења ендотела (Deanfield *et al*, 2007). Друга група метода омогућава процену способности ендотела да ствара и ослобађа вазодилаторне супстанце, на првом месту NO. Ове методе се често означавају као функционалне, јер се њима проверава могућност изазивања ендотел-зависне вазодилатације крвног суда. Најзначајније методе које се користе у савременој истраживачкој и клиничкој пракси наведене у табели 2.

**Табела 2 –Најзначаније савремене методе за процену ендотелне функције**

1) Циркулишуће маркери

Концентрација  $\text{NO}_3^-$ /нитрозилисаних продуката у плазми

Асиметрични диметил аргинин (ADMA)

Фон Вилебрандов фактор (vWF)

Е-селектин

Р-селектин

Интрацелуларни адхезиони молекул (ICAM)

Васкуларни адхезиони молекул(VCAM)

Однос t-PA/ PAI

Циркулишуће зреле и прогениторске ендотелне ћелије

2) Ендотел-зависна вазодилатација

Инвазивни тестови

При коронарној ангиографији

Венска плетизмографија подлактице

Неинвазивни тестови

Ендотел-зависна вазодилатација (FMD) применом васкуларног ултразвука

#### 1.2.4.1.Процена ендотелне функције на основу циркулишућих маркера

Одређивањем серумске концентрације различитих ендотелних продуката могућа је индиректна процена ендотелне функције. Неки од ових продуката, као што је NO, ослобађају се од стране здравог ендотела, док је ослобађање других, као што су проинфламаторни цитокини, адхезиони молекули или регулатори тромбозе, повезано са патолошком активацијом ћелија.

Имајући у виду да је NO гас и слободни радикал веома кратког полуживота, који се из ендотелних ћелија ослобађа у ниској концентрацији и брзо дифундује и реагује са рецепторским молекулима, а затим се инактивише везујући се за погодне аминокислеинске остатке или друга једињења, директно мерење концентрације NO у крви није могуће. Међутим, ендотелна продукција NO може се индиректно проценити одређивањем серумске концентрације нитрита или нитрозилисаних протеина (Deanfield *et al*, 2007). Недостатак ове методе је у ниској специфичности, јер наведена једињења могу потицати и из других азотних извора, укључујући и унос једињења азота исхраном.

Познато је да у случају ендотелног оштећења долази до промене фенотипа са повећаним ослобађањем антикоагулантних чинилаца од стране ендотелних ћелија. Могуће је релативно једноставно мерење серумске концентрације фон Вилебрандовог фактора, који се такође, ослобађа у случају ендотелног оштећења, а има прокоагулантну, протромботичну улогу, тако да се често користи као сурогат маркер ендотелне дисфункције (Mannuci *et al*, 1998). Плазматски vWf је водећи плазматски маркер ендотелне дисфункције, његовог генерализованих оштећења и степена активности атеросклеротског процеса (Balen *et al*, 2007). То је гликопротеин који се, уз минималне количине у тромбоцитима и мегакариоцитима, претежно синтетише у ендотелним ћелијама унутар којих се складишти у специфичним Weiber-Paladeovim телашцима. Из њих се може брзо мобилисати помоћу тромбинахистамина, фибрина, механичким стресом или медијаторима запаљења. Значајан је податак да се ниво vWf у плазми нормално повећава током већег физичког напора 2-3 пута, а његовог пропептида 5-8 пута (Burg *et al*, 2000).

Постоје сазнања која повезују ниво vWf-а у плазми и изостанак његовог очекиваног пораста на стимулацију (Balen *et al*, 2007).

На бази доступних проспективних студија са vWf, постоји могућност повезаности плазматских нивоа vWf са ризиком од развоја васкуларних инцидената (Whincup *et al*, 2002). Концентрације vWf-а у плазми предложене су тако и као независни кардиоваскуларни фактор ризика (Whincup *et al*, 2002). Према садашњим сазнањима, ове концентрације су у слабој корелацији са развојем коронарне болести у општој популацији, али значајну предиктивну улогу исказују у болесника са развијеним КВБ, дијабетесом и старијих испитаника. Иако преовладава мишљење са ниво vWf-а рефлектује општи ендотелни функционални поремећај, још увек је нејасно у којој мери имају директан ефекат на појаву и тежину артеријске тромбозе (Vita *et al*, 1990). Према доступној литератури (Balen *et al*, 2007) ниво vWf-а у плазми, пре и након субоптималног физичког напора, уверљив је тест процене ендотелне функције у клиничкој пракси. Наиме, међу бројним ендотелним маркерима плазме vWf се истиче као једини који се синтетише на захтев, и у случају надражаја нагло излучује. Трајно повећано ослобађање vWf-а са повећаним базалним нивоима у плазми, током развијене ендотелне дисфункције, вероватно изазива пражњење његових резерви у ендотелним ћелијама (Balen *et al*, 2007). vWf у плазми, или ослобођен измењеним ендотелним ћелијама и/или активираним тромбоцитима на местима васкуларних повреда, има јак протромбиснски ефекат тако што изазива и адхезију и агрегацију тромбоцита, посебно у условима високог „shear“ стреса.

#### **1.2.4.2. Процена ендотелне функције неинвазивним методама**

Увођењем ултрасонографије у клиничку праксу довело је до огромног напретка у неинвазивној дијагностици у кардиологији и ангиологији. Johann Cristian Doppler, прашки професор математике и геометрије је 1842. године описао тзв. Doppler-ов ефекат који важи за све енергије таласне природе, а методу је први за проучавање функције срца употребио у Јапану Sotomuro (Vuille *et al*, 1994). Watson i Rushmer су 1963. године искористили пулсатилност ултразвучног таласа

примењујући ултразвучни flow-метар. Duplex scan представља комбиновану технику Б-мод приказа у реалном времену и Doppler ултрасонографије, а Triplex scan има и могућност колор Doppler сонографије (Vuille *et al*, 1994). Од 1993. године уведен је Power-angio (Color Doppler energy) мод који поред приказа брзине и варијансе (ширине) спектра Doppler сигнала приказује и трећи параметар фазног помака, тј. енергију или јачину Doppler сигнала. Као и код других обољења и стања, са новијим техничким достигнућима на пољу ултразвучне дијагностике, и у овој области последњих година стављен је акценат на изналажењу методологије за неинвазивно праћење ендотелне функције, на благовремено откривање првих знакова ендотелне дисфункције, као и могућу регресију ових промена током терапије. Овакав тест треба да задовољи следеће захтеве: тачност, репродуцибилност, зависност од ендотелне функције, разликовање испитаника са и без ендотелне дисфункције, корелација са коронарним ендотелом. Обзиром на анатомски положај и функционалне карактеристике најзначајнији су прегледи ултразвучном сондом спроводних артерија средње величине: a.carotis communis са почетним деловима a.carotis interne и a.carotis externe, a.radialis, a.femoralis, a.brachialis и a.coronariae.

Рани знак атеросклерозе је хипертрофија у артеријском зиду. Повећано задебљање интима-медие (intima-media thickness- ИМТ) је неизвазивни маркер промене артеријског зида, која се може лако проценити на каротидним артеријама помоћу високо резолутивног ултразвука у Б моду. Постоје два приступа мерења ИМТ: 1) ручно мерење на бројним екстракранијалним деловима каротида, и 2) аутоматско компјутеризовано мерење, на дисталном делу заједничке каротидне артерије. Између истраживача нађене су разлике у ручном мерењу између 0.09 до 0.13 mm и 0.12 до 0.18 mm (апсолутне вредности). Најбољу репродуцибилност ручног мерења ИМТ је нађена на унутрашњем зиду заједничке каротидне артерије 1 cm од рачвања на месту где су две паралелне структуре зида без локалног задебљања. Вредност ИМТ заједничке каротидне артерије највише зависи од година старости. За млађу популацију (20 до 30 година) средња вредност ИМТ је 0.5 mm, док је вредност ИМТ од 0.9 mm нађена код старије популације (60 до 70 година).

Вредности ИМТ корелирају са другим факторима ризика као што је систолни крвни притисак, вредности серумских липида и пушење, као и присуство коронарне артеријске болести код жена и мушкараца. Многобројни научни докази о корелацији између вредности ИМТ и кардиоваскуларних догађаја као што је цереброваскуларни инсулт и инфаркт миокарда у клиничким студијама о прогресији атеросклерозе и кардиоваскуларним исходима навели су Америчко удружење за одобрење лекова (FDA) да прихвати 2D ултразвук као валидну технику у клиничким студијама о атеросклерози. Регресија или успоравање задебљања каротидне ИМТ након употребе разних антихипертензивних и лекова за снижење вредности серумских липида је такође публиковано. Мерење дебљине каротидне ИМТ има и предиктивну вредност за будуће васкуларне догађаје. Метода је довољно сензитивна да би се користила у клиничким студијама и може се користити и као показатељ ефикасности терапије (Ludwig *et al*, 2003)

Неинвазивна процена ендотелне функције спроводних артерија, обзиром да је зависна од дводимензионог праћења дијаметра крвног суда и од Doppler-ског праћења протока и његових карактеристика, подложна је променама и зависна од утицаја низа фактора:

- величина крвног суда- спроводне артерије већег луминалног пречника дају слабију проток-зависну вазодилатацију од спроводних артерија мање калибраже истог испитаника
- старење под чијим се утицајем бележи слабији одговор током ендотел-зависне релаксације васкулатуре спроводних артерија
- хормонске варијације (менструални циклус)- у фоликуларној и лутеалној фази циклуса спроводне артерије дају издашнију ендотел-зависну релаксацију, него у менструалној фази циклуса

- постпрандијалне варијације-после оброка богатог масним киселинама бележи се смањење ендотел-зависне релаксације спроводних артерија и до 50%
- физичка активност-тренинг младих здравих особа значајно поправља ендотел-зависну релаксацију, која се такође удвостручује регистравањем један сат после тридестминутног тренинга у односу на вредност пре тренинга

Обзиром да је реч о једној врло суптилној дијагностичкој процедури, присутан је и низ ограничења: оптималност слике посматране артерије, константност позиционирања трансдјусера и интраиндивидуалне варијације проток-зависне дилатације артерија. Важно је нагласити да тест процењује само вазомоторни аспект ендотелне функције.

#### **1.2.4.2.1. Процена ендотелне функције на основу ендотел-зависне вазодилатације**

Овим методама се процењује способност васкуларног ендотела да омогући вазодилатацију крвног суда након примене одређеног стимулуса. Сматра се да је вазодилатација посредована синтезом и ослобађањем NO, тако да се заправо процењује биорасположивост васкуларног NO (Quyyumi *et al*, 2003).

Прва клиничка испитивања ендотелне функције су извршена у коронарној циркулацији приоменом технике која представља практично прилагођавање оригиналног експеримента Furchgot-a и Zawadsk-ог (Furchgot and Zawadzki, 1980). Ова техника се састојала у мерењу промене попречног пресека крвног суда након примене ацетил-холина приликом квантитативне коронарне ангиографије (Cox *et al*, 1998). Приоменом ацетил холина постиже се вазодилатација коронарне артерије само у случају очуване ендотелне функције, док у случају ендотелне дисфункције, вазодилатација изостаје или настаје парадоксна вазоконстрикција. Парадоксна вазоконстрикција је објашњава директним дејством ацетилхолина на глатке

мишиће, у условима када је продукција NO смањена или изостаје, те нема његовог дилататорног учинка (Ludmer *et al*, 1986). Касније су оваква функционална испитивања усавршена применом катетера који омогућавају и мерење величине коронарног протока, уз примену антагониста NO, поред ацетилхолина, како би се потврдило да је вазодилатација заиста ендотел-зависна (Deanfield *et al*, 2007). Инвазивна природа ових метода представља значајно ограничење за ширу клиничку примену, нарочито у случајевима када је потребно серијско праћење ефеката одређене интервенције.

Најшире прихваћена метода процене ендотелне функције је метода протоком изазване, ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије (flow mediated dilation, FMD) (Deanfield *et al*, 2007). Ово је неинвазивна метода и заснива се на примени васкуларног ултразвука високе резолуције ради одређивања процентуалне промене попречног дијаметра брахијалне артерије након хиперемичког стимулуса.

Прво испитивање испитивање вазореактивности брахијалне артерије спровели су 1989. године Anderson и Mark (1989), а процену ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије увели су 1992.године Celermajer и сарадници (Celermajer *et al*, 1992 ), да би током последње деценије двадесетог века метода постала широко прихваћена, како у научном истраживању, тако и у клиничкој пракси. Takase и сарадници су 1998. године показали да постоји висока корелација између ендотелне функције процењене приликом коронарне катетеризације и применом методе протоком изазване вазодилатације брахијалне артерије (Takase *et al*, 1998), потврдивши да је ендотелна функција, као и дисфункција, системски процес.

Применом ове методе, показан је повезаност смањене вазодилатације брахијалне артерије са експозицијом различитим традиционалним и новооткривеним факторима ризика за коронарну болест (Faulx *et al*, 2003). Изразито редукована ендотелна функција, процењена FMD методом, има високу сензитивност, специфичност и предиктивну вредност у индентификацији особа са



коронарном болешћу међу асимптоматским особама са високим кардиоваскуларним ризиком (Enderle *et al*, 1998). С друге стране, очувана вазодилатација брахијалне артерије има високу негативну предиктивну вредност код особа с ризиком за коронарну болест.

Неинвазивна природа FMD методе омогућава њену широку примену код рзличитих група ипитаника, укључујући здраве особе, ако и неограничен број поновних мерења уколико за тим постоји потреба.

#### **1.2.4.2.1.1. Техника процене ендотелне функције методом протоком изаване вазодилатације брахијалне артерије**

Испитаници не треба да узимају храну најмање 8 до 12 сати пре студије зато што постпрандијални период утиче на величину протоком изаване вазодилатације. Поред тога не треба да конзумирају пића која садрже кофеин, зелени или црни чај, да пуше или узимају препарате витамина Ц најмање 4 до 6 сати пре студије. Не саветује се већа физичка активност, као што је спортксии тренинг, минимум 24 сата пре испитивања. Пожељно је да испитивач буде упознат са периодом менструалног циклуса жена којима се врши испитивање, узевши у обзир да и овај фактор утиче на вредност FMD-а. Према важећим Препорукама за испитивање ендотелне функције методом протоком изаване вазодилатације, саветује се да се сви лекови са вазоактивним дејством буду искључени из терапије пре студије, у временком периоду који одговара неколико полуживота ових лекова- Испитивање је потребно вршити у исто доба дана како би се избегао потенцијални утицај циркадијалних варијација на вредност FMD-а (Cognati *et al*, 2001).

Потребно је да испитаник заузме лежећи положај на леђима најмање 0 минута пре почетка студије, а рука на којој се врши мерење треба да буде ослоњена на чврсту подлогу и да се не помера до краја студије. Ултразвучни трансдјусер се поставља на означено место, 5 до 10 центиметара изнад антекубиталне фосе руке на којој се врши испитивање. Примена колор Doppleга омогућава индетификацију артерије. Снимање се врши у 2Д моду у лонгитудиналној равни, тако што се

одабере сегмент артерије у коме се јасно визуелизује интималне површине предњег и задњег зида артерије. Да би се то постигло неопходно је да ултразвучни сноп пресеца уздужни пресек брахијалне артерије по правим углом. Након адекватног позиционирања ултразвучне сонде, врши се снимање брахијалне артерије у базалним условима протока крви и одређује се базални попречни дијаметар, као средња вредност најмање три попречна дијаметра на различитим местима дуж одабраног сегмента артерије. Мерење попречног дијаметра се увек врши синхроно са почетком Р зупца на ЕКГ-у, како би одговарало крају дијастоле. FMD се одређује у крвним судовима чији је попречни дијаметар између 2,5 и 5mm, што одговара унутрашњем промеру брахијалне артерије већине одраслих особа (Correti *et al*, 2001).

Да би се створио хиперемички стимулус неопходан за FMD, повеска апарат за мерење крвног притиска (сфингоманометра) се поставља на надлактицу руке на којој се врши испитивање. Манжетна се надувава до вредности притиска која је барем 50mmHg, изнад систолног артеријског притиска испитиване особе, како би се спречио проток крви кроз артерије оклудираних подручја. Трајање оклузије је стандардизовано на 5 минута, јер продужено трајање оклузије не доприноси повећању хиперемичког стимулуса. Надувавањем манжетне изазива се исхемија подручја подлактице, која ауторегулаторним механизмом доводи до вазодилатације крвних судова у исхемичном подручју. Након наглог попуштања манжетне, настаје кратоктарјна реактивна хиперемичка у дилатираним крвним судовима подлактице и повећање брзине протока крви кроз брахијалну артерију, чиме се изазива повећање тангенсијалне силе смицања (shear stress-a). Повећање shear stress-a ендотела брахијалне артерије је стимулус за ослобађање NO и дилатацију артерије. Да би се одредила максимална вазодилатација потребно је континуирано снимање уздужног пресека истог сегмента брахијалне артерије на коме је одређен базални дијаметар. Препоручује се да снимање почне 30 секунди пре попуштања сфингоманометра и да траје најмање 2 минута након изазивања хиперемичког стимулуса. Уобичајно је да се попречни дијаметар брахијалне артерије измерен у 60.секунди од попуштања повеске прихвати као Dmax

Вредност протоком изазване вазодилатације се дефинише као проценат промене попречног дијаметра крвног суда при максималној ендотел-зависнох вазодилатацији ( $D_{max}$ ) у односу на базални дијаметар артерије ( $D_{baz}$ ) и израчунава се према формули:

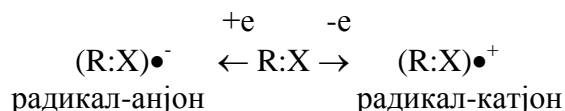
$$FMD = [ ( D_{max} - D_{baz} ) / D_{baz} ] \times 100.$$

Не постоји консензус о томе колика је нормална вредност FMD-а, али се сматра да код здравих особа долази до повећања попречног дијаметра брахијалне артерије између 5 и 15%, што одражава очувану ендотелну функцију (Faulx et al, 2003). Сходно томе, може се сматрати да постоји ендотелна дисфункција уколико је вазодилатација брахијалне артерије мања од 5%, а у неким случајевима вазодилатација потпуно изостаје или настаје парадоксни констрикторни одговор. Траба имати у виду вредности FMD-а опада са годинама старости испитиване особе, тако да код мушкараца долази до постепеног снижавања вредности након 40. године живота, а код жена снижавање протоком изазване вазодилатације настаје нагло након менопаузе, просечно око 50. године (Taddei et al, 2001).

### 1.3. Оксидационо-редукциони процеси

#### 1.3.1. Слободни радикали

Слободни радикали (SR) представљају молекуле, атоме или јоне који имају један или више неспарених електрона у својој структури, односно налазе се између оксидованог и редукованог стања (Valko et al, 2007). Неспарени електрон је узрок високе и неселективне реактивности SR. Слободни радикали могу бити неутрални, али и позитивно (радикал-катјон) или негативно наелектрисани (радикал-анјон):



За слободне радикале карактеристичне су три фазе: фаза иницијације, фаза пропације и фаза терминације.

- У фази иницијације нерадикали примају или губе један електрон, чиме им се значајно мењају физичке и хемијске особине.
- У фази пропације новонастали слободни радикал активира околне хемијске врсте (циљни молекул), одузимајући им један електрон, при чему се сам стабилише, а циљни молекул се преводи у форму слободног радикала. С обзиром на то да су веома реактивни, настали слободни радикали делују даље и за кратко време вишеструко се умножи број слободних радикала. На тај начин, добија се низ сукцесивних, ланчаних реакција које се саме пропацирају, чиме је омогућена брза и интензивна пропација ових хемијских облика.
- Фаза терминације је период заустављања - неутрализације слободних радикала и њихове пропације. За овај тип реакција задужени су: неензимски оксиданси, ензимски оксиданси и судар два слободна радикала.

Слободни радикали настају током нормалног метаболизма у свим ћелијама и, обзиром да имају потенцијал да реагују са читавим низом хемијских врста, имају многобројне функције у ћелијској сигнализацији и ензимологији (Dröge, 2002). Као део нормалне метаболичке активности ћелије укључени су у многе функције ћелије *in vivo*, али уколико измакну контроли они постају веома реактивни и штетни за ћелију јер могу оштетити бројне функционалне путеве у њој.

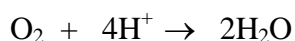
Слободни радикали настају од нерадикала који су по својој природи слабо реактивни јер у својим орбиталама имају паран број електрона односно имају спарене електроне супротног спина. Процеси током којих настају слободни радикали укључују и ензимски катализоване реакције и неензимске путеве.

У принципу, термин „слободни радикали“ подразумева низ органских и неорганских молекула, укључујући и метале, металне јоне и металне комплексе, међутим у пракси се под слободним радикалима обично мисли на неметалне хемијске врсте, као што су реактивне кисеоничне и реактивне азотне врсте (Hurd and Murphy, 2009).

#### 1.3.1.1. Реактивне кисеоничне врсте (ROS)

Молекул кисеоника ( $O_2$ ) је и сам слободни радикал јер има два неспарена електрона својој валентној орбитали. Редукција молекулског кисеоника врши се на

унутрашњој мембрани митохондрија, у процесу респирације, где он прима четири протона и четири електрона и редукује се до молекула воде:



У ћелијама аеробних организама током нормалног метаболизма, највећи део кисеоника се потпуно редукује до воде у респирационом ланцу или као супстрат у ензимским реакцијама. Међутим, при редукцији молекулског кисеоника мањим бројем електрона, што се дешава у око 1 - 3 % случајева (Valko *et al*, 2007), настају делимично редуковани међупроизводи – високо реактивни облици кисеоника, који се у литератури срећу под називима: реактивни метаболити кисеоника - ROM (*Reactive Oxygen Metabolites*) (Cotgreave *et al*, 1988), токсични метаболити кисеоника - TOM (*Toxic Oxygen Metabolites*) (Мујовић, 1998), или реактивне врсте кисеоника - ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Halliwell and Gutteridge, 1985).

ROS настају дејством ензимских и неензимских система смештених на плазматској мембрани, у цитосолу и на мембранама органела (Dargel, 1991; Moldovan and Moldovan, 2004; Hurd and Murphy, 2009).

Реактивне кисеоничне врсте често се поистовећују са слободним радикалима, што је суштинска и термилошка грешка, јер нису само реактивне кисеоничне врсте слободни радикали, нити су све реактивне кисеоничне врсте слободни радикали. ROS се деле у 2 групе (Halliwell and Gutteridge, 1999):

- 1) слободни радикали кисеоника
- 2) нерадикалски облици кисеоника.

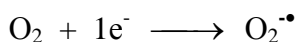
**Табела 3 .** Реактивне врсте кисеоника.

Слободни радикали <sup>1</sup>		Нерадикалски облици	
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Супероксид анјон радикал	$\text{H}_2\text{O}_2$	Водоник пероксид
$\bullet\text{OH}$	Хидроксил радикал	$\text{HOCl}$	Хипохлорна киселина
$\text{HO}_2^{\bullet}$	Хидропероксил радикал	$\text{O}_3$	Озон
$\text{RO}^{\bullet}$	Алкоксил радикал	$^1\text{O}_2$	Синглет кисеоника
$\text{RO}_2^{\bullet}$	Пероксил радикал	$\text{ROOH}$	Органски хидропероксид

1.3.1.2. Настанак и особине појединих ROS

1.3.1.2.1. Супероксид анјон радикал ( $O_2^{\bullet-}$ )

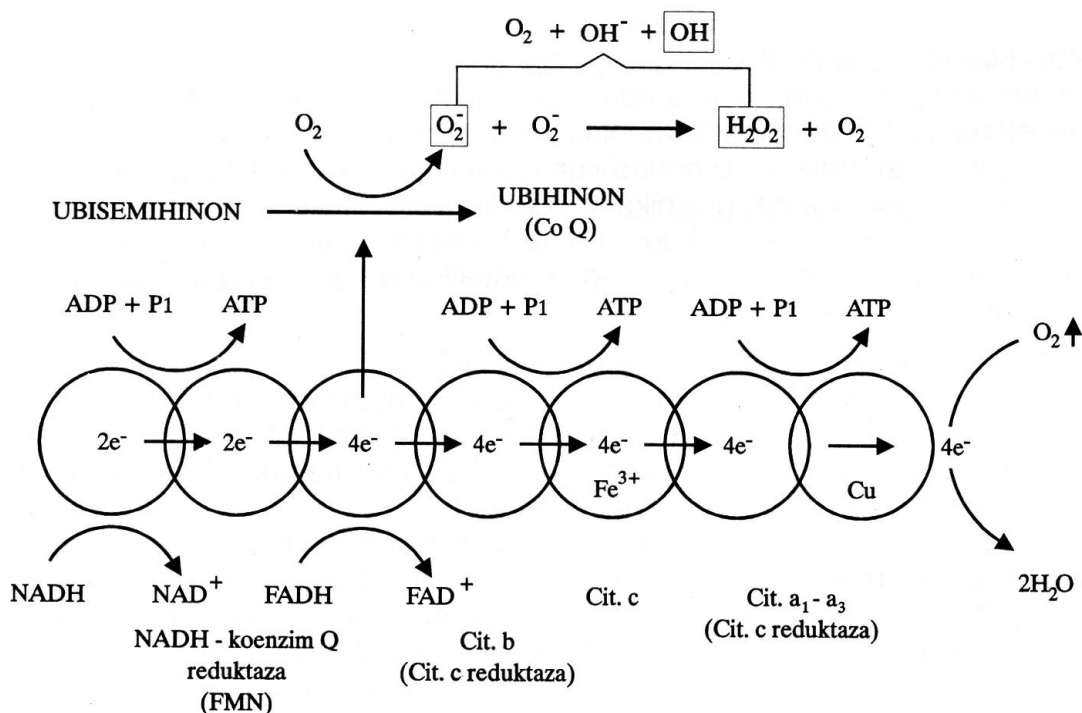
Постоји много путева којим  $O_2^{\bullet-}$  може настати *in vivo*. Ипак, најзначајнији начин његовог настанка јесте једноелектронска редукција молекулског кисеоника у електронском транспортном ланцу (Raha and Robinson, 2000):



Стварање  $O_2^{\bullet-}$  у митохондријама догађа се када електрони, који се нормално транспортују дуж низ мембранских протеинских комплекса до терминалног електронског акцептора, пређу директно на  $O_2$ . Ово „бежање“ електрона догађа се на 2 места у електронском транспортном ланцу: у региону NADH дехидрогеназе и у региону коензима Q (Wolin *et al*, 2002) односно на комплексу I, где се  $O_2^{\bullet-}$  ствара углавном у матриксу митохондрија, и на комплексу III, где се  $O_2^{\bullet-}$  ствара на обе стране унутрашње митохондријалне мембране ( St Peirre *et al*, 2002).

Низ фактора, међу којима и висока локална концентрација кисеоника, може узроковати продукцију  $O_2^{\bullet-}$  у електронском транспортном ланцу (Green *et al*, 2004; Korshunov *et al*, 1997; Nicholis, 2004).

Схема 1. Продукција ROS у митохондријама.

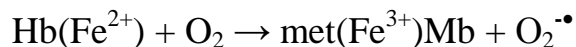


Степен продукције  $O_2^{\bullet}$  варира од ткива до ткива, од организма до организма, као и у зависности од различитих услова. Сматра се да у митохондријама сисара 0.15 – 2 % електрона који се транспортују кроз електронски транспортни ланац „побегне“ (St Peirre *et al*, 2002).

Од девет билошких реакција у којима настају ROS, респираторна оксидација је једна од најважнијих јер су количине продукованог  $O_2^{\bullet}$  свим осталим механизмима у већини случајева мање него количине продуковане од стране митохондрија (Hurd and Murphy, 2009). Изузетак од овога чине стања у ком активирани фагоцитни ћелије врше интензивну експресију ензимских комплекса названих NADPH оксидазе на својим плазма мембранама (Henderson and Chappel, 1996). Ови ензими користе NADPH да редукују молекуларни кисеоник, стварајући велике количине супероксид анјон радикала на екстрацелуларној површини мембране као токсички агент током „гутања“ микроба (Henderson and Chappel, 1996). Осим тога, недавно је откривен читав низ изоформи NADPH оксидаза (the Nox family) у нефагоцитним ћелијама које генеришу  $O_2^{\bullet}$  као одговор на различите факторе раста и цитокине (Bedard and Krause, 2007).

Осим комплекса NADPH оксидаза, које су дизајниране да продукују супероксид анјон радикал, постоји више протеина који продукују  $O_2^{\bullet}$  као међупродукт њихове нормалне функције (као електронски транспортни ланац у митохондријама) (Hurd and Murphy, 2009). Неки од њих су: неспецифичне пероксидазе, ксантин оксидаза, циклооксигеназа, нитропропан оксидаза, триптофан диоксигеназа, алдехид оксидаза, синтаза азот монооксида и др. (de Groot and Littauer, 1989). Такође одређени број биомолекула, укључујући глицералдехид, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>, одређене хормоне и неуротрансмитере, аутооксидује у присуству кисеоника стварајући  $O_2^{\bullet}$  (Halliwell and Gutteridge, 1999)

Супероксид анјон радикал настаје и аутооксидацијом високореактивних хемијских једињења, првенствено једињења са кондензованим хетероциклима у структури: флавина и леукофлавина (Sichel *et al*, 1987); хинона и хидрохинона (McCord and Fridovich, 1969); тиола (McNeil *et al*, 1981); катехоламина (Cohen and Heikkila, 1974); као и оксидацијом хемоглобина (Hb) и миоглобина (Mb) (Petkau, 1986)



*O<sub>2</sub><sup>•-</sup> као редокс сигнал*

Обзиром да је јон, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> он не може слободно да прође двослојни липидни слој ћелијске мембране и делује као сигнал унутар ћелије (Wolin *et al*, 2002), већ једино кроз јонске канале (Bedard and Krause, 2007). Судбина већине продукованог O<sub>2</sub><sup>•-</sup> јесте његова дисмутација у водоник пероксид, било ензимским или неензимским путем, који затим дифундује из лумена у цитоплазму ћелија (Hurd and Murphy, 2009). Други начин да O<sub>2</sub><sup>•-</sup> уђе у ћелију јесте да буде протонизован (у хидропероксил радикал (HOО<sup>•</sup>)) и онда пасивно дифундује, међутим иако га ова протонизација чини неутралним и много способнијим да прође мембрану, она се не сматра важним механизмом јер се на физиолошком рН врло мала количина O<sub>2</sub><sup>•-</sup> може протонизовати (Hurd and Murphy, 2009).

Супероксид анјон радикал је сам по себи релативно нетоксичан јер није посебно реактиван са већином биомолекула већ се његова токсичност испољава након реакције са другим слободним радикалима (као што је азот моноксид (NO)) и прелазним металима (као што је гвожђе) (Hurd and Murphy, 2009). Зато није чудно што већина протеина за које се зна да реагују са O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, укључујући акотиназу (Gardner and Fridovich, 1991), гуанилил циклазу (Brune *et al*, 1990), рибонуклеотид редуктазу (Cooper *et al*, 1996), фосфатазу 2В (Namgaladze *et al*, 2002) и регулатор супероксидног одговора (SoxR) (Dempfle, 1996), садржи гвожђе. Инактивација ових ензима од стране супероксид анјон радикала, посебно акотиназе, може имати драматичне последице по ћелијски метаболизам (Hurd and Murphy, 2009). Реакција са O<sub>2</sub><sup>•-</sup> са NO<sup>•</sup> (који је такође слободни радикал) је једна од најбржих реакција у човековом организму, а њен производ пероксинитрит (OONO<sup>•</sup>) је веома реактивна (једна од најтоксичнијих) кисеонична честица (Halliwell and Gutteridge, 1999, Dröge, 2002). Штетност супероксид анјон радикала за ћелију огледа се у томе што он може да учествује у настајању других реактивних врста кисеоника (на пример H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH, OONO<sup>•</sup>).

С друге стране O<sub>2</sub><sup>•-</sup> може изазвати деполимеризацију полисахарида (Fridovich, 1978), инактивирање вируса, уништавање бактерија, оштећење ензима и ћелијских мембрана, затим индуковати пероксидацију липида, реметити синтезу



DNA и транскрипцију RNA, учествовати у процесима канцерогенезе. (Đorđević *et al*, 2000);

#### Разградња $O_2^{\bullet -}$

Главни начин разградње  $O_2^{\bullet -}$  јесте реакција између два супероксид анјон радикала при којој настаје водоник пероксид ( $H_2O_2$ ). У киселој средини ово је спонтана реакција, а на физиолошком рН реакција дисмутације је вођена ензимом супероксид дизмутаза (SOD).

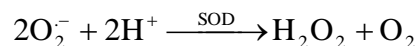


$O_2^{\bullet -}$  који избегне дисмутацију или реагује са NO формирајући пероксинитрит, или реагује на различите начине са транзиционим металима, учествује у Фентоновој реакцији са водоник пероксидом при чему настаје хидроксил радикал, или бива протонизован у хидропероксил радикал. Иако је количина протонизованог  $O_2^{\bullet -}$  *in vivo* мала,  $HO_2^{\bullet}$  може да уђе у фосфолипидни двослој и иницира липидну пероксидацију (Antunes *et al*, 1996).

#### 1.3.1.2.2. Водоник пероксид ( $H_2O_2$ )

##### Настанак $H_2O_2$

Водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) је најстабилнији облик ROS. Он нема неспарених електрона и није слободни радикал. Највећи део продукованог водоник пероксида настаје дисмутацијом супероксид анјон радикала продукованог од стране митохондрија или NADPH оксидаза (Hurd and Murphy, 2009):



Водоник пероксид такође може бити продукован од стране других ензима који продукују  $O_2^{\bullet -}$ . Најчешће место настанка водоник пероксида су пероксизоми, митохондрије, микрозоме и мембране ендоплазматског ретикулума (Sies, 1985). Настаје дејством не само SOD, већ и урат оксидаза и оксидаза неких Д-амино киселина, као и у реакцијама аутооксидације витамина Ц, глутатиона, тиола и катехоламина (Halliwell and Gutteridge, 1999). Велика количина водоник пероксида

настаје у катаболизму допамина, активношћу МАО-В изоензима, на спољним мембранама митохондрија, у ћелијама глије (Sandri *et al*, 1990).

#### *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> као редокс сигнал*

Способност H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> да делује као редокс сигнал зависи од места његове продукције. Без обзира да ли је H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> настао екстрацелуларно (нпр. од стране фагоцита), у оквиру органела (нпр. у митохондријама) или потиче из других ћелија, да би деловао као сигнал он мора проћи фосфолипидни двослој како би стигао до протеинских мета које се углавном налазе у цитоплазми ћелија (Hurd and Murphy, 2009). Због липосолубилне природе, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> може дифундовати кроз мембране и изазвати промене далеко од места његовог стварања. Такође, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> може бити активно транспортован и кроз аквапоринске канале (Hurd and Murphy, 2009). Ипак, иако H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> може слободно дифундовати преко мембрана одређене промене у липидној и протеинској структури мембрана могу умањити његову доступност специфичним протеинским метама.

Главни механизам којим H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> делује као сигнал јесте путем специфичне, реверзибилне модификације кључних аминокиселина и протеина (Hurd and Murphy, 2009). Цистеинске резидуе су најчешће место на протеинима модификовано од стране H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, али и друга места на протеинима такође могу да „осете“ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hurd and Murphy, 2009). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> делује као редокс сигнал или реагујући директно са тиолима цистеинских остатака протеина чиме доводи до промене самог протеина или индиректно преко тиоредоксина или глутатиона (Hurd and Murphy, 2009). У неким случајевима продукти ових реакција инхибирају протеинску функцију блокирајући важне каталитичке резидуе као што је нпр. каталитичка цистинска резидуа на протеину тирозин фосфатази (van Montfort *et al*, 2003). С друге стране, модификације протеинских мета могу довести до њихових конформационих измена и промењених интеракција са другим протеинима, што може активирати или инхибирати њихову функцију (Storz *et al*, 1990). Штетни ефекти H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> су дозно зависни. Ниски нивои водоник пероксида делују пре пролиферативно него антипролиферативно (Lo *et al*, 1996).

Уласком у ћелију инхибира синтезу аденозин три фосфата (АТФ) како у гликолизи тако и у оксидативној фосфорилацији (Cohrane, 1991)

$H_2O_2$  може да доведе до оксидације сулфхидрилних група протеина и до иницијације процеса липидне пероксидације. Међутим, много је опасније индиректно деловање водоник пероксида који у реакцији са супероксид анјон радикалом или јонима метала ( $Fe^{2+}$ ) доводи до стварања изузетно реактивног хидроксил радикала ( $\bullet OH$ ) који је најснажнији активатор пероксидације мембранских липида (Rhee 2006; Valko *et al*, 2007).

### Разградња $H_2O_2$

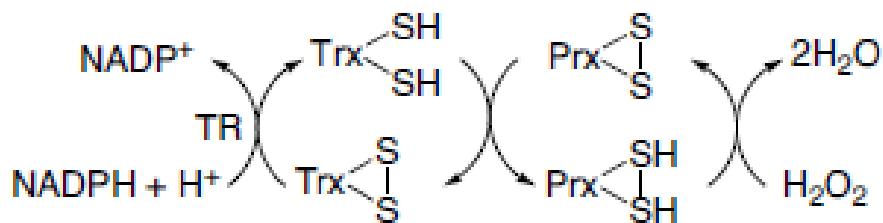
Постоји низ начина на који антиоксидативни заштитни систем брани организам од штетних дејстава  $H_2O_2$ . Најзначајнији типови протеина који смањују количину водоник пероксида су каталазе, пероксиредоксини и глутатион пероксидазе (Hurd and Murphy, 2009).

Каталаза је специфична хем пероксидаза која разграђује  $H_2O_2$  директно у воду и молекулски кисеоник:



Пероксиредоксини су фамилија ензима који катализују реакцију  $H_2O_2$  и алкил хидропероксида до воде и алкохола користећи редуковане еквиваленте обезбеђене од стране протеина који садрже тиоле, као што су тиоредоксин (Trx) или тиоредоксин редуктаза (TR) и NADPH, али њихова каталитичка ефикасност је ниска (Hurd and Murphy, 2009).

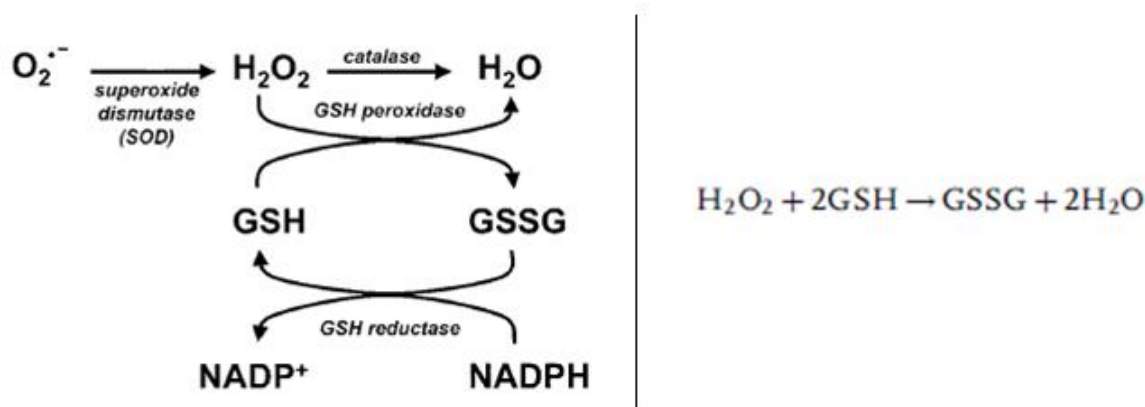
**Схема 2.** Уклањање  $H_2O_2$  од стране пероксиредоксина.



Друга важна група ензима одговорна за уклањање  $H_2O_2$  јесу глутатион пероксидазе. Постоје бар 4 изоформе овог ензима. Ови ентими примарно су

лоцирани у митохондријама и цитосолу, док су каталазе примарно лоциране у пероксизомима. Глутатион пероксидаза уклања  $\text{H}_2\text{O}_2$  повезујући његову редукцију до воде са оксидацијом глутатиона до глутатион дисулфида (Hurd and Murphy, 2009).

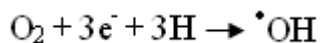
Схема 3. Уклањање  $\text{H}_2\text{O}_2$  од стране глутатион пероксидазе.



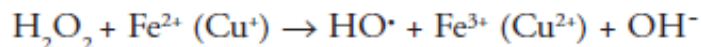
### 1.3.1.2.3. Хидроксил радикал ( $\bullet\text{OH}$ )

#### Настанак $\bullet\text{OH}$

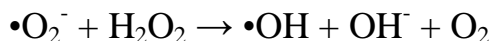
Хидроксил радикал ( $\bullet\text{OH}$ ) је најтоксичнија реактивна врста кисеоника (Hurd and Murphy, 2009). Настаје непотпуном редукцијом молекулског кисеоника са три електрона и три протона:



Главни извор хидроксил радикала је водоник пероксид који лако пролази кроз липидни двослој мембране и у присуству јона прелазних метала ( $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Cu}^+$ ) ствара ову врсту ROS. Ова реакција је позната као Фентонова реакција:



Реакција између супероксид анјон радикала и водоник пероксида у присуству редокс активних металних јона као што је гвожђе такође доводи до стварања хидроксил радикала (Haber-Weiss-ова реакција):

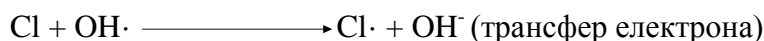
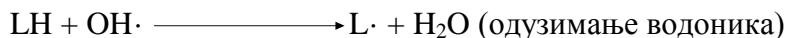


## •ОН као редокс сигнал

Хидроксил радикал је изузетно реактиван и веома токсичан оксидант. Он има веома кратак полуживот ( $10^{-9}$  s) па реагује у непосредној близини места настанка (Valko *et al*, 2007). За разлику од  $O_2^{\bullet}$  и  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$  нема специфичног партнера, као што је неки рецептор или биомолекул, преко ког врши сигнализирање већ било који биолошки молекул може бити његова мета. На пример, он реагује са једињењима као што су аскорбинска киселина, глутатион, цистеин, метионин, хистидин, албумин, хемоглобин, гуанин, аденозин и цитозин брзином од  $10^9 - 10^{10}$  m/s (Hurd and Murphy, 2009). То у суштини значи да ће  $\bullet OH$  модификовати и обично уништити било који од ових молекула ако дође у додир са њима (Halliwell and Gutteridge, 1999).  $\bullet OH$  може оксидовати различите аминокиселине и изазвати низ модификација нуклеотида. Реагујући са незасићеним масним киселинама иницира каскаду радикалских пропагирајућих реакција које доводе до огромних оштећења (Hurd and Murphy, 2009).

Осим са уобичајеним ћелијским метама, као што су протеини, нуклеотиди и масне киселине,  $\bullet OH$  може реаговати и са неорганским врстама којих има у изобилју у ћелији. У реакцијама са карбонатним ( $CO_3^{2-}$ ) и водоник карбонатним ( $HCO_3^-$ ) анјонима долази до стварања  $OH^-$  и карбонатног радикала ( $CO_3^{\bullet}$ ) који је такође потентан оксидант, мада мање од  $\bullet OH$  (Hurd and Murphy, 2009).

Дакле, хидроксил радикал реагује са скоро свим биомолекулима: алкохолима, органским киселинама, шећерима, аминокиселинама, фосфолипидима и нуклеотидима при чему настају одговарајући органски радикали. Овим је створена могућност даље пропације слободно-радикалских процеса и следствено томе, даљих оштећења биомолекула у реакцијама одузимања водоника, адиције и реакције трансфера електрона.



Висока реактивност  $OH\cdot$  и мала селективност чине га веома опасним по интегритет и функционалност ћелије. Као резултат серије реакција може настати и

пероксил радикал ( $\text{RO}_2^\bullet$ ) који даље пропагира слободне радикалске процесе посебно оне на мембранама.

Реакција између два хидроксил радикала резултује стварањем  $\text{H}_2\text{O}_2$ , чиме се значајно умањује штета везана за  $^\bullet\text{OH}$ , међутим значај ове реакције *in vivo* је много мањи него *in vitro* (Halliwell and Gutteridge, 1999).

#### 1.3.1.2.4. Синглет кисеоник ( $^1\text{O}_2$ )

##### *Настанак $^1\text{O}_2$*

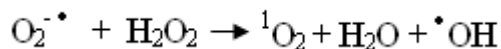
Молекуларни кисеоник је слободни радикал са два неспарена електрона паралелних спинова. Променом спина једног од валентних електрона молекуларног кисеоника настаје електронски побуђени облици кисеоника - синглет кисеоник (Halliwell and Gutteridge, 1999). Као и водоник пероксид, и синглет кисеоник спада у нерадикалске форме ROS, али је снажан оксидациони агенс.

Синглет кисеоник може да настане у различитим реакцијама:

- Интеракцијом два супероксид анјон радикала:

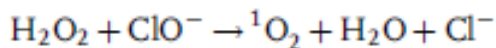


- У Haber-Weiss-овој реакцији:



- У фотосензитивним реакцијама - осветљавањем фотосензибилних једињења у присуству кисеоника (биолошки пигменти - хлорофил, флавоноиди, порфирини и очни пигмент - ретинол). Ова једињења способна су да приме квант светлосне енергије, чиме прелазе у нестабилно побуђено стање. Да би се стабилисала, она предају вишак енергије околина - у виду емисије светлости. Уколико се у тој околина налази молекуларни кисеоник, он ће примити емитовану енергију и настаће синглет стање (Đorđević *et al*, 2000).
- Метаболичка продукција  $^1\text{O}_2$  догађа се и у стимулираним неутрофилима у којима  $^1\text{O}_2$  настаје у серијама реакција које укључују мијелопероксидазе које користе

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и хлора (Cl<sup>-</sup>) да створе хипохлорне јоне (ClO<sup>-</sup>) који потом у реакцији са H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стварају синглет кисеоник (Steinbeck *et al*, 1992):



<sup>1</sup>O<sub>2</sub> као редокс сигнал

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> може реаговати са низом биомолекула као што су DNA, протеини и липиди (Halliwell and Gutteridge, 1999). Ове реакције укључују оксидацију, хидроксилацију и O<sub>2</sub>-адитивне реакције (Hurd and Murphy, 2009). На пример: <sup>1</sup>O<sub>2</sub> хидроксилира деоксигуанозин (саставни део ДНА) до 8-хидроксидеоксигуанозина; алкене преводи у (цикличне) пероксиде – ова реакција доводи до липидне пероксидације; цистеин преводи у цистин или на крају у цистеичну киселину, сулфонску киселину (Cys-SO<sub>3</sub>H).

Штетно дејство <sup>1</sup>O<sub>2</sub> огледа се у стварању ендопероксида, хидропероксида, фенола, хинона и сулфоксида; због способности да реагује са незасићеним масним киселинама липидних мембрана може да иницира процес липидне пероксидације а може лако прећи и у друге облике ROS (Ђорђевић *et al*, 2000).

### 1.3.1.2.5. Липидна пероксидација

Липидна пероксидација је термин који описује уградњу молекуларног кисеоника у структуру полинезасићених масних киселина (Polyunsaturated fatty acids - PUFA) у биолошким мембранама (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Последице пероксидације липида плазма мембрана су (Ђорђевић *et al*, 2000):

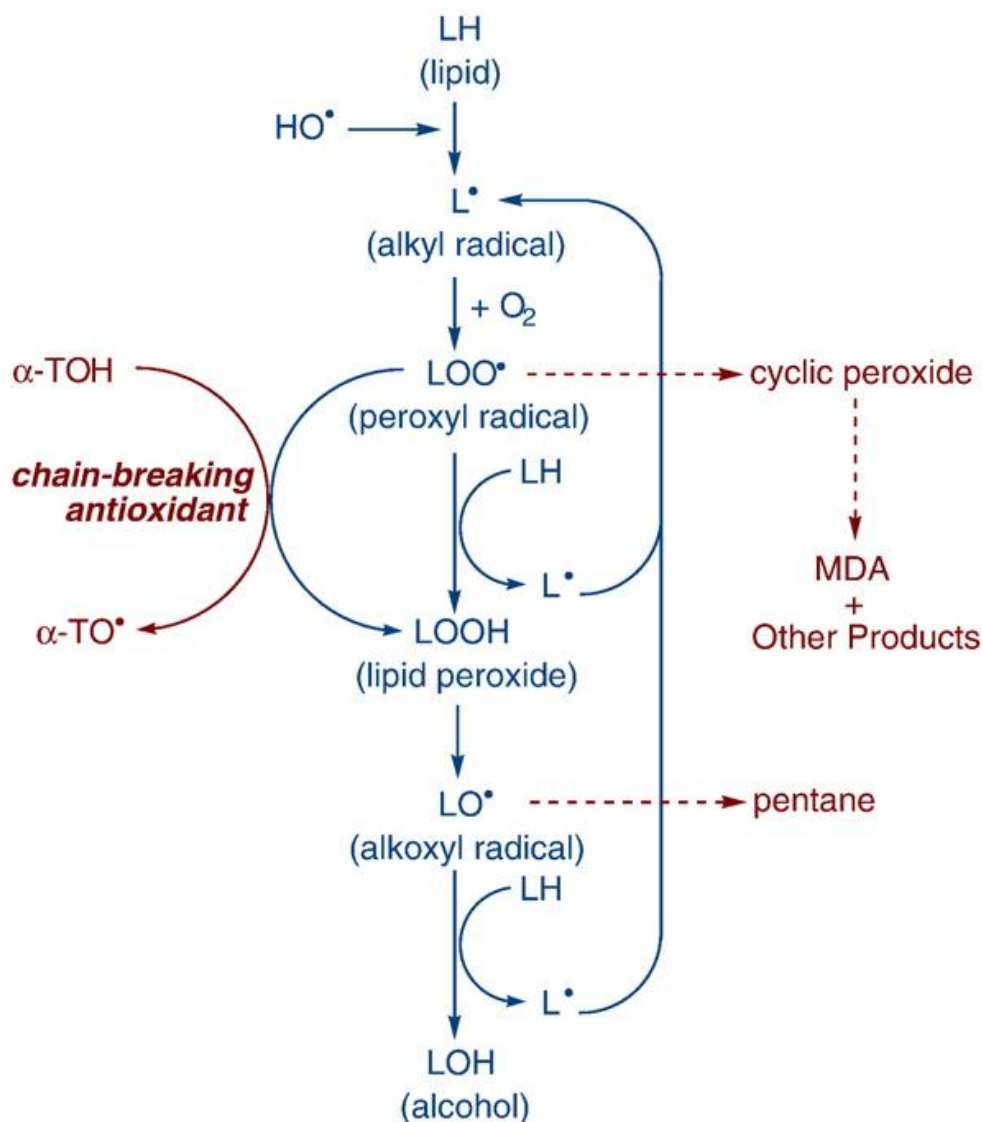
- Поремећај флуидности ћелијске мембране - могуће „цурење” садржаја цитосола у ванћелијску средину
- Појачана пропустљивост за једновалентне и двовалентне јоне – услед чега може доћи до промене осмотског притиска у ћелији и ван ње
- Инактивација ензима;

- Оштећење система преноса информација са рецептора на мембрани на унутарћелијске системе, с обзиром на то да су неки липиди категоризовани као секундарни гласници.

Овај процес може тећи на два начина: ензимским или неензимским путем.

Ензимски пут укључује оксидацију липида стереоспецифичном адицијом молекуларног кисеоника полинезасићеним масним киселинама од стране ензима као што су липооксигеназа и циклооксигеназа. Ови ензими катализују оксидацију арахидоната до простагландина и леукотриена, док оксидацију холестерола до хидроксихолестерола катализује цитохром P450 (Niki *et al*, 2005) .

**Схема 4.** Липидна пероксидација (Sachdev and Davies, 2008).





Оксидација фосфолипида посредована реактивним кисеоничним и азотним врстама доводи до настајања изопростана, продуката сличним продуктима насталим горе поменутиим ензимским катализовањем (Morrow *et al*, 1992). Радикали који могу да одузимају водоников атом полинезасићеним масним киселинама су алкоксил радикали ( $RO\cdot$ ), пероксил радикали ( $RO_2\cdot$ ), хидропероксил радикали ( $HO_2\cdot$ ), неколико гвожђе-кисеоник комплекса и хидроксил радикал ( $\cdot OH$ ) (Sevanian *et al*, 1990).

ROS иницирају липидну пероксидацију одузимањем водониковог атома метиленској групи у  $\alpha$  – у положају у односу на двогубу везу у молекулу PUFA (Halliwell and Gutteridge, 1999). Одудимањем Н – атома, који носе по 1 електрон, на С – атому метил – групе PUFA остаје 1 неспарени електрон – заправо настаје липидни радикал ( $L\cdot$ ). У циљу стабилисања новонасталог хемијског облика дешава се премештање електрона дуж угљоводоничног низа PUFA што за последицу има премештање двогубих веза и стварање коњугованих диена. Адицијом молекулског кисеоника на овакав радикал, на месту С – атом радикала, настаје пероксил радикал ( $LOO\cdot$ ).

У фази пропагације, пероксил радикал започиње следећу фазу тако што одузима Н – атом и то:

- Са сопственог угљоводоничног ланца, чиме улази у процес аутооксидације

На овај начин настају циклични пероксил радикали и циклични ендпероксил радикали, који даљим премештањем двогубих веза у процесу  $\beta$  – оксидације, дају алкене и алкине скраћених ланаца и посебно токсичне хидрокси алкене који даље настављају ланчану оксидацију околних PUFA.

- Са угљоводоничног ланца околних PUFA

На овај начин се генеришу нови липидни пероксиди и липидни радикали:



Липидни пероксиди ( $LOOH$ ), као примарни производи липидне пероксидације су изузетно потентни генератори слободних радикала, и они воде пропагацији реакције – стварају ланчани процес узастопне оксидације околних/сопствене PUFA. Као липосолубилна једињења они су способни да

дифундују кроз липидни двослој плазма мембране и да се преносе и на удаљене регионе у мембрани.

Хомолитичком разградњом О – О везе у LOOH, у присуству Fe<sup>2+</sup> - јона, настају хидроксил радикали (·OH) и алкоксил радикали (LO·) у класичној Фентоновој реакцији



Алкоксил радикали могу ући у једну од 3 могуће реакције:

- Узимањем Н – атома из молекула воде могу генерисати нови хидроксил радикал и ацил – хидроксид



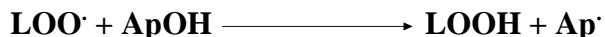
- Узимањем Н – атома из околних PUFA (RCOOH) могу генерисати липидни пероксид (LOOH) и нови ацил – радикал (RCO·)



- Могу ући у процес β – оксидације којим настају ацил – алдехиди скраћеног ланца

Трећа фаза, фаза терминације, подразумева заустављање ланчаних реакција на један од два начина:

- Сударом два слободна радикала, услед чега настаје стабилан нерадикалски производ
- Дејством *антиоксидационог система* – ензимског и неензимског



Неензимски антиоксидациони системи у реакцији са LOO· стварају ароматични радикал (Ar·) који је стабилисан резонанцијом па стога и слабо реактиван. Димеризацијом ароматичних радикала процес се зауставља.

Као крајњи производ липидне пероксидације PUFA настаје малонил – диалдехид (MDA). У киселој средини он кондензује са 2 молекула ТВА (тиобарбитурна киселина) дајући производ који апсорбује у видљивом делу

спектра, са апсорпционим максимумом на 532 nm. То је уједно и доказна реакција за липидну пероксидацију у неком биолошком систему и квантитативна мера присуства липидних пероксида у систему.

Липидни пероксиди се *in vivo* разграђују кроз низ компликованих реакција из којих настаје низ продуката као што су епоксиди, засићени алдехиди, незасићени алдехиди и хидрокарбони (Spiteller and Spiteller, 1998). Продукти липидне пероксидације активирају путеве ћелијског сигнализирања на неколико начина као што су формирање ковалентних веза са протеинима или нековалентно везивање за протеинске рецепторе. Излагање високим концентрацијама продуката липидне пероксидације може изазвати низ ћелијских одговора, од акутних токсичних ефеката до инхибиције ћелијске пролиферације (Hurd and Murphy, 2009). У ниским концентрацијама продукти липидне пероксидације могу стимулирати неколико процеса као што је активност неколико ензима (аденилил циклазу, фуанилил циклазу и фосфолипазу Ц) или транскрипциона регулација антиоксидативних гена (као што су они укључени у метаболизам глутатиона и хем оксидазе I) (Ceaser *et al*, 2004).

Низ антиоксиданаса и ензима је укључено у контролу и регулацију интрацелуларних концентрација липидних пероксида и продуката њихове разградње. Високи нивои аскорбата,  $\alpha$ -токоферола и глутатиона могу инхибирати липидну пероксидацију и „ухватити“ липидне пероксиде. На пример, нивои хидропероксида естерификованих масних киселина, као што су фосфолипидни хидропероксиди, бивају умањени од стране фосфолипидне хидропероксидне глутатион пероксидазе, мада их и пероксиредоксин 6 и глутатион трансфераза могу умањити (Hurd and Murphy, 2009). Алтернативно, фосфолипидни хидропероксиди могу бити одвојени од мембране дејством фосфолипаза а затим на ослобођене пероксиде масних киселина могу деловати интрацелуларне глутатион пероксидазе, тиоредоксин редуктазе, пероксиредоксин 6 и глутатион трансферазе (Hurd and Murphy, 2009).

## 1.3.1.2. Реактивне азотне врсте

Поред реактивних кисеоничних врста висок оксидациони потенцијал поседују и реактивне врсте азота – RNS (*Reactive Nitrogen Species*).

Табела 4. Реактивне врсте азота.

Слободни радикали		Нерадикалски облици	
NO·	Азот моноксид	NO <sup>+</sup>	Нитрозил катјон
NO <sub>2</sub> ·	Азот диоксид	NO <sup>-</sup>	Нитроксил анјон
		HNO <sub>2</sub>	Азотна киселина
		N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Диазот триоксида
		N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Диазот тетроксида
		NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Нитронијум јон
		ONOO <sup>-</sup>	Пероксинитрит
		RONOO	Алkil пероксинитрити

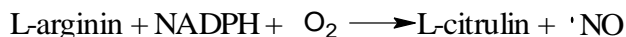
Азот моноксид ( $\cdot\text{NO}$ ) је главни представник реактивних азотних врста а метаболизам NO и његова реактивност воде до стварања много других RNS, пре свега пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), а затим и азот диоксида ( $\text{NO}_2\cdot$ ), диазот триоксида ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), диазот тетроксида ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ).

Као и реактивне врсте кисеоника, и ове врсте имају низ функција које нису увек лоше по живу ћелију, али и поседују врло велику биореактивност и потенцијал за нарушавање физиолошке функције протеина, липида, угљених хидрата и нуклеинских киселина (Hussain *et al*, 2003).

Подела на ROS и RNS није јасна и често није корисна, обзиром да већина RNS такође садржи кисеоник и понекад је тешко рећи да ли реактивност ове врсте потиче од кисеоника или азота. Зато се у литератури усталио назив RONS (*Reactive Oxygen and Nitrogen Species*).

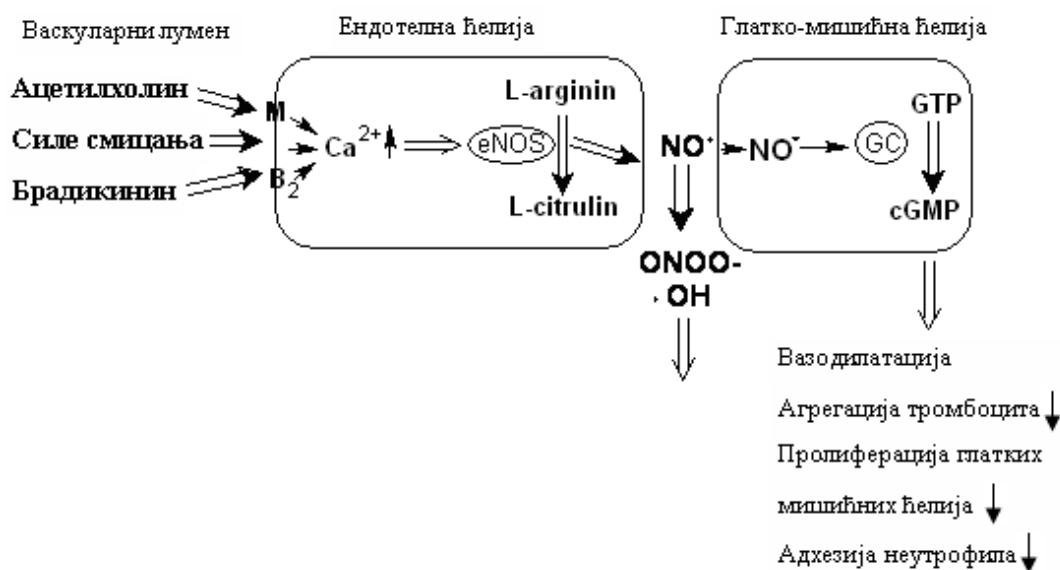
### 1.3.1.2.1. Азот моноксид (NO)

Азот моноксид ( $\cdot\text{NO}$ ) је слободни радикал са многобројним улогама у редокс сигнализацији.  $\cdot\text{NO}$  настаје у ћелијама под дејством фамилије ензима једним именом назване „азот моноксид синтазе“ (Nitric Oxide Synthases - NOSs) које, уз помоћ NADPH, а у присуству више редокс-кофактора, катализују оксидацију терминалног гванидног азотног атома L-arginin-a, продукујући  $\cdot\text{NO}$  и L-citrulin (5).



$\cdot\text{NO}$  има кратак полуживот у ћелијама, око 0,1 до 2 секунде, али захваљујући својој липофилности слободно дифундује кроз ћелијску мембрану, и испољава своје паракрино деловање у радијусу од 100–200 $\mu\text{m}$  од његовог извора (Liu *et al*, 1998). Радикалска природа  $\cdot\text{NO}$  налаже да су његове главне мете супстанце са металним центрима и парамагнетске супстанце, укључујући и друге слободне радикале (Hurd and Murphy, 2009). Генерално,  $\cdot\text{NO}$  сигнализирање је у складу са класичним сигналним парадигмама која укључују контролисане количине продукције, специфичну реактивност са протеинима и пратећу промену у активности/функцији, појачавање секундарних сигнала или метаболизма који „искључује“ сигнал (Hurd and Murphy, 2009).

Схема 5. Стварање  $\cdot\text{NO}$  и његово основна дејства у крвним судовима.



Главни начин на који  $\cdot\text{NO}$  делује као сигнални молекул јесте реверзibilно везивање за одређене транзитне металне јоне као што су, на пример, протеини који

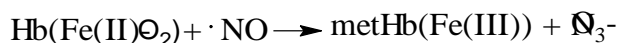
садрже хем као простетичну групу. Везивањем за солубилну гуанилат циклазу (sGC) он изазива њену конформациону промену, повећавајући активност овог ензима и резултујући повећаним нивоима цикличног гуанозин монофосфата (cGMP), што доводи до релаксације глатких мишићних ћелија (Xu *et al*, 2005). Везивањем за комплекс IV у митохондријама изазива реверзибилну инхибицију респирације (Brown and Cooper, 1994).

·NO сигнализирање је врло разнолико. Једно од обележја разноликости ·NO сигнализирања односи се на његову способност да изазове и акутне и хроничне одговоре. На пример, ·NO пореклом из ендотела активира sGC и иницира сигналну каскаду која рапидно резултује вазодилатацијом васкуларних глатких мишића (Moncada, 1999; Ignarro *et al*, 1999). С друге стране, исти тај ·NO пореклом из ендотела регулише транскрипцију гена разних протеина у зиду крвних судова, што се генерално сматра његовом протективном улогом која лимитира инфламацијом индукована оштећења (Shiva *et al*, 2004). Овај процес се одиграва сатима и посредован је и sGC зависним и sGC независним механизмима. Ова два примера илуструју комплексност и разноликост ·NO сигнализирања, како по временском оквиру у ком се догађа одговор, тако и по могућим „метама“ и њиховој локализацији (субцелуларна или целуларна). Да је компартментализација битна у регулацији ·NO сигнализирања потврђује и следећи пример: миоцити врше експресију и pNOS и eNOS, с тим што се експресија ових изоформи врши у различитим деловима ћелије. Активација ових изоформи доводи до различитих ефеката на срчану контрактилност – pNOS, локализована у саркоплазматском ретикулуму, стимулише  $\beta$ -адренергичне зависне контракције, а eNOS, локализована у сарколеми, инхибира  $\beta$ -адренергичне зависне контракције (Barouch *et al*, 2002).

NO може да реагује са многим биомолекулима, да изазове инхибицију активности многих ензима, да измени структуру ДНК, да изазове липидну пероксидацију, али исто тако може да делује и као антиоксидант и да штити ћелију од агената који индукују оксидациони стрес (Eiserich *et al*, 1998). На тај начин регулише многе биолошке одговоре: индукцију и активацију гена, апоптозу, цитостазу, стимулацију имуног одговора, неуротрансмисију, инхибицију агрегације

тромбоцита, релаксацију васкуларне мускулатуре (Mayer and Hemmens, 1997).  $\cdot\text{NO}$  може играти физиолошке улоге штитећи од стимулуса који могу изазвати оштећења, или може имати улогу у патолошким механизмима који чине темељ развоја болести.  $\cdot\text{NO}$  сам по себи није моћан цитотоксични агенс, али реакцијама са радикалским облицима кисеоника формира различите реактивне кисеонично–азотне врсте (RNOS), које су моћни оксидујући агенси са цитотоксичним деловањем. Ови индиректни биолошки ефекти  $\cdot\text{NO}$  (посредством RNOS) подразумевају различита нитрозовања, оксидације и нитровања биомолекула, што доводи до нарушавања физиолошке функције протеина, липида, угљених хидрата и нуклеинских киселина (Eiserich *et al*, 1998).

При ниској концентрацији  $\cdot\text{NO}$  може реаговати са хемоглобином и ова реакција представља примарни механизам уклањања и детоксификације  $\cdot\text{NO}$  *in vivo* (конверзија у нитрате) (Moncada, 1999):



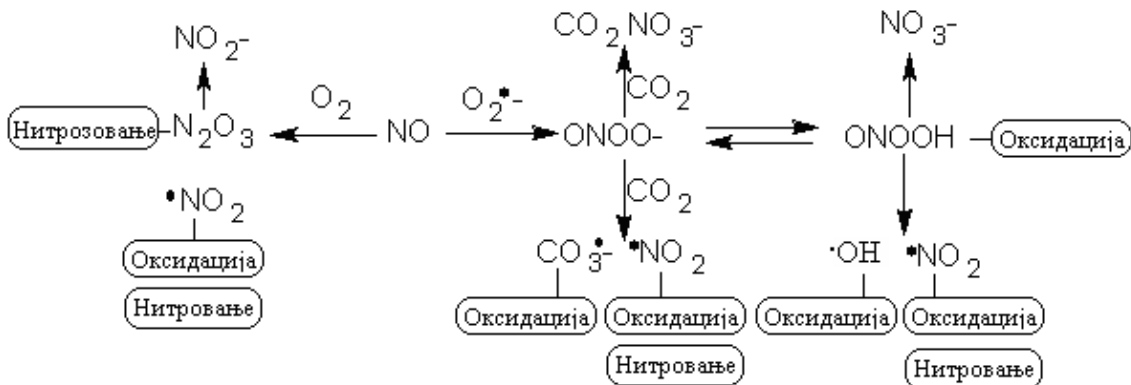
Аутооксидација  $\text{NO}$  такође ограничава његов полуживот (Wink and Mitchell, 1998). У гасној фази  $\text{NO}$  реагује са  $\text{O}_2$  формирајући високо реактиван слободни радикал  $\cdot\text{NO}_2$  (Shafirovich and Lymar, 2002), док у растворима његова аутооксидација резултује формирањем нитрита  $\text{NO}_2^-$  (Hurd and Murphy, 2009)

$\text{NO}$  је слободни радикал, па се његова реактивност према другим слободним радикалима, ради упаривања неспареног електрона, практично подразумева. Једна од најбржих реакција у биологији  $\cdot\text{NO}$  јесте реакција са супероксид анјон радикалом ( $\text{O}_2^-$ ), а ништа мање брзе нису ни реакције са алкоксил/пероксил радикалима ( $\text{RO}\cdot$  и  $\text{ROO}\cdot$ ) (Hurd and Murphy, 2009).  $\cdot\text{NO}$  реагује и са молекуларним кисеоником, али је кинетика ове реакције много спорија.

Проста аутооксидација  $\cdot\text{NO}$  у нитрите ( $\text{NO}_2^-$ ), односно реакција између  $\cdot\text{NO}$  и  $\text{O}_2$  доводи до пораста продукције оксидованих, нитрованих и нитрозованих врста као што су азот диоксид ( $\text{NO}_2$ ) и диазот триоксид ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ). Реакција између  $\cdot\text{NO}$  и  $\text{O}_2^-$  доводи до стварања пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ), јаког оксиданта који може да реагује или директно са тиолима и металним центрима, или да се комбинује са водородом пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и угљен диоксида ( $\text{CO}_2$ ). Пероксинитрит може реаговати са угљен диоксида при чему настаје карбонатни радикал ( $\text{CO}_3^-$ ) и азот

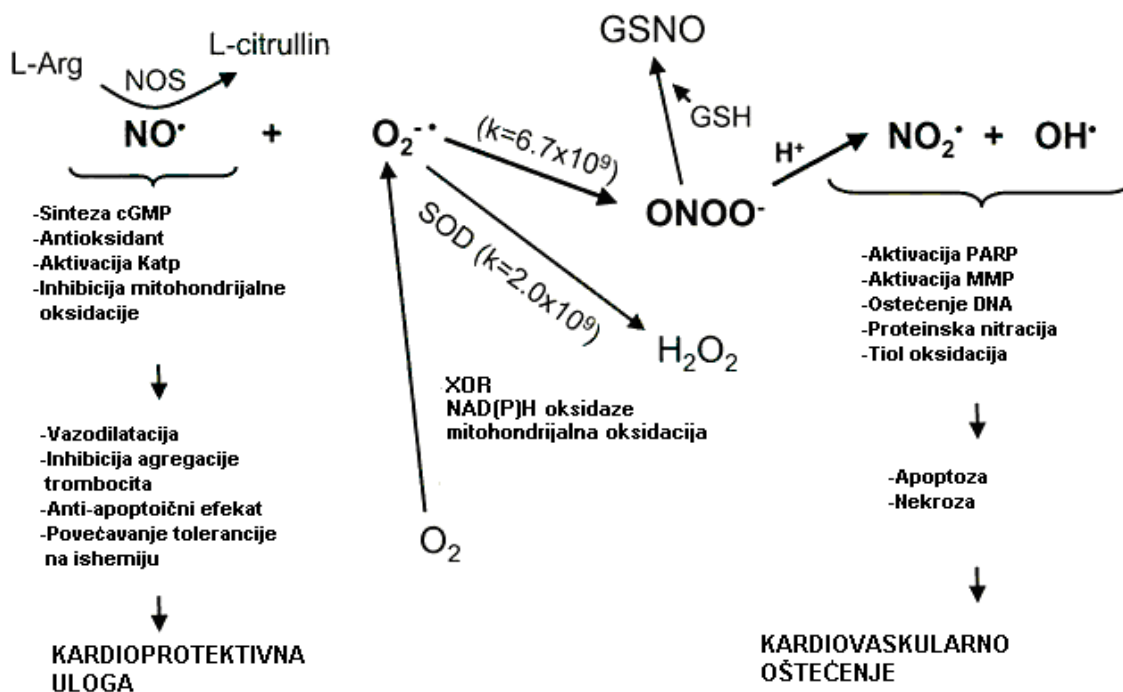
диоксид ( $\cdot\text{NO}_2$ ), који може дифундовати из растварача (30%) или се рекомбиновати и формирати угљен диоксид и нитрате ( $\text{NO}_3^-$ ) (70%). Протонацијом пероксинитрита настаје пероксинитритна киселина која може бити хомолитички „очишћена“ при чему настају хидроксил радикал ( $\cdot\text{OH}$ ) и азот диоксид (30%), или њиховом рекомбинацијом настају нитрати (70%).

Схема 6. Реакције између  $\cdot\text{NO}$  и слободних радикала.



Реакција између  $\cdot\text{NO}$  и  $\text{O}_2^{\bullet-}$  контролише интрацелуларне концентрације оба ова слободна радикала, а такође и отвара огромно подручје хемије пероксинитрита, укључујући оксидативне реакције, нитровање тирозина, хидроксилацију. Реакција између  $\cdot\text{NO}$  и  $\text{O}_2^{\bullet-}$  је дифузно лимитирана, што значи да је једини ограничавајући фактор за ову реакцију вероватноћа да се ова два молекула сударе у простору (Hurd and Murphy, 2009). Реагујући са  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\cdot\text{NO}$  инаktivира одређене количине  $\text{O}_2^{\bullet-}$  и делује цитопротективно, испољавајући улогу својеврсног чистача ROS, али се при том и сам инаktivира, и уз то генерише можда и најтоксичнију реактивну врсту (пероксинитрит). Губитак  $\cdot\text{NO}$  сигнализирања повезан је са ендотелном дисфункцијом у разним кардиоваскуларним обољењима (Freeman *et al*, 1995). Све у свему,  $\cdot\text{NO}$  је сам по себи слаб оксидант, он не нитрује нити нитрозује биомолекуле, али реакцијама са другим слободним радикалима доводи до стварања секундарних RNS, од којих су неки, као нпр.  $\text{ONOO}^-$ , високотоксични.



Схема 7. Дејства  $\cdot\text{NO}$  и  $\text{ONOO}^-$  на кардиоваскуларни систем.

У нормалним условима, равнотежа између вазоконстрикторних (ангиотензин II, ендотелин, тромбоксан) и вазодилаторних супстанци (простациклин, ендотел-зависни хиперполаришући фактор, брадикинин, азот моноксид), које су, између осталог, продукт ендотела, померена је у смеру вазодилатације, у великој мери захваљујући  $\cdot\text{NO}$ . Осим индукције вазорелаксације путем cGMP-зависних протеинкиназа и тиол-редокс (cGMP-независним) механизмом (Bolotina et al, 1994),  $\cdot\text{NO}$  утиче на васкуларни тонус на још један начин. Наиме,  $\cdot\text{NO}$  утиче на синтезу простангладина, у првом реду простациклина ( $\text{PGI}_2$ ) који са  $\cdot\text{NO}$  остварује асоцијативно дејство. У физиолошким условима  $\cdot\text{NO}$  и  $\text{PGI}_2$  делом независно, а делом синергистички учествују у одржавању флуидности крви, међутим интеракција  $\cdot\text{NO}$  са редокс-супстанцама (нпр. са  $\text{O}_2\cdot^-$  у правцу стварања  $\text{ONOO}^-$ ) нарушава баланс између простациклина и тромбосана ( $\text{TXA}_2$ ), чиме се подстиче проагрегаторни и проадхезивни ефекат тромбосана (тромбоксан је физиолошки антагониста простациклина) (Starčević et al, 1984). Ова молекуларна интеракција такође помера равнотежу синтезе  $\text{PGI}_2$  уназад према примарним простагландинима ( $\text{PGH}_2$ ), који такође делују проагрегаторно и протромбички (Zou et al, 1999)

Пад продукције  $\cdot\text{NO}$  намеће се као важан механизам настанка ендотелне дисфункције (губитак својстава нормалног, здравог ендотела). Неки од стимулуса за које се зна да доводе до *up-regulacije* eNOS су: хипоксија (Arnet *et al*, 1996), VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Hood *et al*, 1998), инхибитори HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) редуктазе (Laufs *et al*, 1998), хипертиреодизам (Colin *et al*, 1997), док су стимулуси који доводе до *down-regulacije* TNF- $\alpha$ 4 (tumor necrosis factor - alpha 4), оксидовани LDL (low density lipoprotein) (Blair *et al*, 1999), хипотиреоза (Colin *et al*, 1997), хипертензија (Crabos *et al*, 1997), дисбаланса у метаболизму липида (Roberts *et al*, 2005).

Оксидативни стрес такође представља један од важних фактора са утицајем на ендотелну функцију и биорасположивост  $\cdot\text{NO}$ -а.  $\text{O}_2^{\cdot-}$  умањује функцију eNOS скраћујући полуживот  $\cdot\text{NO}$ -а и умањујући његову расположивост, и при том долази до настајања високотоксичног  $\text{ONOO}^-$  (Haram, 2006). Ова реакција је повезана са мноштвом патофизиолошких стања, док у нормалним условима  $\text{O}_2^{\cdot-}$  бива елиминисана од стране SOD. Реактивне кисеоничне врсте такође регулишу васкуларну функцију модулишући ћелијски раст, апоптозу, миграцију, инфламацију, секрецију и продукцију екстрацелуларног протеинског матрикса (Hansson, 2005). Оксидативни стрес и оштећења њиме изазвана представљају медијаторе васкуларних оштећења и инфламације у многим кардиоваскуларним болестима, нарочито уколико постоје компликације у виду хипертензије, хиперлипидемије, дијабетеса (Haram, 2006).

### 1.3.2. Антиоксидативни заштитни систем

Антиоксидант је свака супстанца која када је присутна у малим концентрацијама у поређењу са оксидабилним супстратом, значајно смањује или спречава оксидацију тог супстрата (Halliwell and Gutteridge, 1999). Термин "оксидабилни супстрат" подразумева скоро сваку супстанцу која може да се нађе у храни или ткивима људи, укључујући протеине, липиде, угљене хидрате и DNA.

Уклањање реактивних облика кисеоника и ублажавање њихових штетних дејстава предуслов је живота у аеробним условима. Током еволуције аеробни организми су развили сложен систем антиоксидационе заштите (*Antioxidant Defense*

*System - ADS*) за спречавање стварања и хватање радикала као и поправку оштећења изазваних кисеониковим радикалима.

Антиоксидациона заштита код сисара је сложена, специфична за врсту, орган и ткиво, а њена регулација је тесно повезана са регулацијом основних метаболичких функција. Такође, многи од ових ензима припадају различитим класама протеина и присуство сваког од изозима може се разликовати од ћелијског типа до ћелијског типа – манган супероксид дисмутаза се анализира у митохондријама, бакар/цинк супероксид дисмутаза у цитосолу, а екстрацелуларна супероксид дисмутаза у екстрацелуларној течности.

Антиоксиданси су молекули који могу деловати пре или током реакција слободних радикала - у фазама иницијације, пропације, терминације и декомпозиције слободних радикала или током следствених реакција оксидованих продуката са осетљивим циљним молекулима (Halliwell *et al*, 2005). Деловање антиоксиданаса се заснива на њиховој способности да делују као хватачи (*scavengers*) слободних радикала, дају електроне, разграђују хидропероксиде липида настале у фази пропације, елиминишу дејство синглетних облика кисеоника, инхибирају неке ензиме или секвестрирају прелазне метале (Masella *et al*, 2005).

Антиоксидативни заштитни систем обухвата примарну и секундарну антиоксидациону заштиту. Примарна антиоксидациона заштита обухвата ензимске и неензимске компоненте (Fridovich, 1995), док секундарна обухвата ензиме репараторе и дезинтеграторе.

Елементе примарне антиоксидативне заштите чине (Percival, 1996):

1. Антиоксиданси пореклом из хране: витамин Ц, витамин Е, бета каротен и други каротеноиди и оксикаротеноиди као што су ликопен и лутеин, полифеноли као што су флавоноиди, флаволи, флавоноли и проантоцијаниди
2. Ендогени антиоксиданси: билирубин, тиоли као што су глутатион, липоична киселина, N-ацетил цистеин, NADPH и NADH, убиквинон (коензим Q 10), мокраћна киселина, ензими: супероксид дисмутаза, каталаза, ензими глутатионског редокс циклуса (глутатион пероксидаза, глутатион-S-трансфераза и глутатион редуктаза)

3. Метал-везујући протеини који заплењују слободне јоне гвожђа и бабра који су способни да катализују оксидативне реакције: албумин, церулоплазмин, феритин, миоглобин, трансферин.

У нормалној ћелији постоји равнотежа између продукције слободних радикала и њиховог уклањања. Међутим, повећана продукција слободних радикала или смањена антиоксидациона заштита ћелија доводи до поремећаја равнотеже између RONS с једне стране и ADS с друге стране (Halliwell and Gutteridge, 1999). У том случају вишак одбеглих ROS регулише с липидима, протеинима, нуклеинским киселинама и полисахаридима изазивајући значајна оштећења. Оксидативни стрес игра примарну или секундарну улогу у патогенези више од 100 акутних и хроничних обољења, као и у патогенези старења (Dalle-Donne *et al*, 2006).

### 1.3.2.1. Ензимске компоненте антиоксидационог заштитног система

#### 1.3.2.1.1. Супероксид дисмутаза (SOD)

Супероксид дисмутаза (SOD) је металопротеин који катализује дисмутацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) у молекулски кисеоник и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) (McCord and Fridovich, 1969):



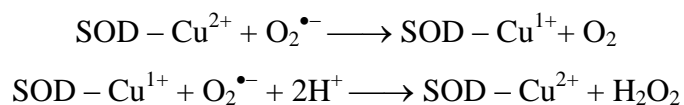
SOD спада у најефикасније биолошке катализаторе икад пронађене. Брзина ензимске реакције износи  $k = 2 - 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , што је за око 10 000 пута брже од спонтане дисмутације супероксид анјон радикала при нормалном pH (Fridovich, 1995).

Постоји неколико облика супероксид-дисмутаза и то: гвожђе садржавајућа супероксид дисмутаза (Fe SOD), манган садржавајућа супероксид дисмутаза (Mn SOD), бакар-цинк садржавајућа супероксид дисмутаза (CuZn SOD) и екстрацелуларна супероксид-дисмутаза (EC SOD) која, иако садржи бакар и цинк, има јасно различиту аминокиселинску секвенцу од CuZn SOD.

Обзиром да супероксид анјон радикал не пролази биолошке мембране он мора бити детоксификован у компартментима где и настаје. Код људи су присутна

три облика супероксид дисмутаза (Zelko *et al*, 2002): у цитосољу CuZn SOD (Ookawara *et al*, 1992), у митохондријама Mn SOD (Taniguchi, 1992) и у екстрацелуларним течностима EC SOD (Oury *et al*, 1996) .

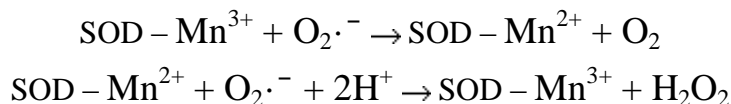
CuZn SOD спада у класу димерних металоензима који катализују дисмутацију  $O_2^{\bullet-}$  преко цикличне оксидо-редукционе реакције помоћу каталитички активног Cu јона:



Ова реакција је дифузионо контролисана, тј. оно што ограничава реакцију да се брже одиграва, је време потребно да супстрат дифундује у активно место.

Екстрацелуларна супероксид дисмутаза (EC SOD) такође садржи Cu и Zn, али као што је већ поменуто, има другачију аминокиселинску секвенцу од CuZn SOD. Присутна је у екстрацелуларној течности: плазми, лимфи и цереброспиналној течности. Због своје локације EC SOD има важну улогу у пресретању  $O_2^{\bullet-}$  отпуштеног од стране фагоцита и других ћелија (Fridovich, 1997). То је од велике важности због смањења реакције између  $O_2^{\bullet-}$  и  $\text{NO}^{\bullet}$  и последичног повећања полуживота  $\text{NO}^{\bullet}$  односно смањења укупне продукције моћног оксиданта пероксинитрита ( $\text{ONOO}^{\bullet}$ ) (Pryor and Squadrito, 1995).

MnSOD обезбеђује заштиту од липидне пероксидације не само у ћелији, већ и ван ње јер се секретује у екстраћелијски простор и тако штити спољну ћелијску мембрану. Она катализује дисмутацију супероксид анјон радикала према следећим једначинама:

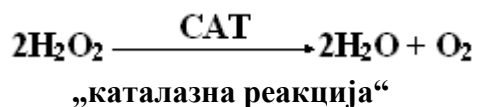


MnSOD је изузетно важна за одржавање редокс равнотеже, њена повећана активност штити ткиво од оксидативног стреса (Epperly *et al*, 2002) али претерана експресија MnSOD која превазилази физиолошке услове може довести до акумулације ROS и оксидативног стреса који доприноси туморским метастазама и ангиогенези (Zhang, 2002).

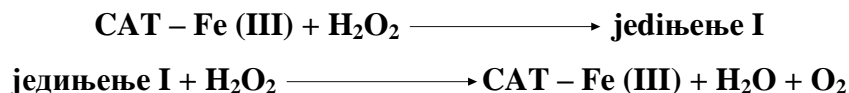
Сматра се да здрав организам дневно производи близу 5 милиона јединица SOD и другог ензима каталазе. SOD ревитализује ћелије, одржава њихову функцију и успорава време и брзину њихове деструкције (Мујовић, 1998).

### 1.3.2.1.2. Каталаза (CAT)

Каталаза (CAT) је ензим који катализује тзв. "каталазну" реакцију, односно претварање водоник пероксида ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), који је настао дисмутацијом супероксид анјон радикала, до воде и молекулског кисеоника.

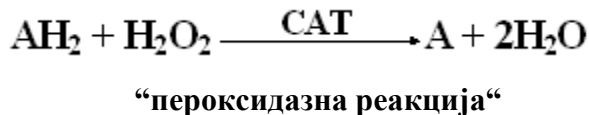


Реакција је двостепена и захтева везивање два молекула водоник пероксида у активном центру ензима:



што је мало вероватно при ниским концентрацијама водоник пероксида. Ова реакција је изузетно брза;  $K_b$  каталазе је  $4 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ .

CAT испољава и тзв. “пероксидазну активност”. Каталаза врши иоксидацију Н-донора уз утрошак једног молекула водоник пероксида у “пероксидазnoj” реакцији, према једначини:



„Каталазна” реакција одвија се брзином  $10^7 \text{mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ , док је брзина “пероксидазне” реакције од  $10^2$ - $10^3 \text{mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ . Да ли ће CAT катализовати брзу каталазну реакцију или спору пероксидазну реакцију зависи од брзине настајања водоник пероксида, као и од концентрације донора водоника. Азот оксид може модулирати обе наведене активности CAT (Brunelli *et al*, 2001).

Каталаза је тетрамерни хемопротенин који се састоји од 4 идентичне субјединице. Садржи хематин (хем- $\text{Fe}^{3+}$  протопорфирин) групу везану у активном

центру (Halliwell and Gutteridge, 1999). Активно место сваке субјединице је стабилизовано са једним молекулом чврсто везаног NADPH.

CAT је присутна у свим ткивима сисара. Највећу активност показује у јетри и еритроцитима, има је мало у мозгу, плућима, оку, срцу и скелетним мишићима, а нема је у ендотелним ћелијама (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Синтетише се у рибозомима, затим преноси до пероксизома. Пероксизоми су респираторне органеле које катаболизују већину супстанци преко  $H_2O_2$  генеришућих ензима. Водоник пероксид, који настаје активношћу ових ензима, разлаже се помоћу каталазе која чини више од 40% свих протеина у пероксизомима. Поред локализације у пероксизомима, каталаза се може налазити и слободна у цитосолу, као што је случај код ретикулоцита и у зрелим еритроцитима. Према Halliwell-у и Guteridge-у (1999), то је највероватније повезано са чињеницом, да се водоник пероксид може генерисати и изван пероксизома (на пример у митохондријама, ендоплазматичном ретикулуму и у самом цитосолу.

Каталаза и глутатион пероксидаза компетитивно конкуришу за водоник пероксид као супстрат у физиолошким условима. Глутатион пероксидаза има мању  $K_m$  за  $H_2O_2$  и због тога показује већу активност у детоксикацији водоник пероксида при малим концентрацијама овог једињења.

Каталаза је нарочито ефикасна *in vivo* у условима високе продукције водоник пероксида. Код недостатка гвожђа се запажа смањена активност каталазе (Acharya *et al*, 1991).

Присуство каталазе у пероксизомима, где под утицајем пероксизомалних ензима настаје водоник пероксид, омогућава заштиту овог дела ћелије од његовог дејства. У другим деловима ћелије каталазе има мање, па улогу у детоксикацији  $H_2O_2$  преузимају пероксидазе.

### 1.3.2.3.2. Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система

Неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система су:

- Липосолубилна једињења: витамин Е, витамин А, провитамин А, коензим Q, каротеноиди, убихинон
- Хидросолубилна једињења: глутатион; витамин Ц, мокраћна киселина и урати; жучни пигменти (билирубин и биливердин), транспортни протеини крвне плазме (албумин, трансферин, церулоплазмин, феритин, лактоферин); аминокиселине (цистеин и хистидин).

#### 1.3.2.3.2.1. Глутатион (GSH)

Тиоли су класа молекула која се карактерише присуством сулфхидрилних остатака (-SH) на њиховим активним местима (Sen and Packer, 2000). Тиоли се синтетишу из сумпорних аминокиселина: цистеина или метионина који је прекурсор цистеина. Тиоли имају многобројне функције у биолошким системима, као што су синтеза протеина, редокс сигнализација и имунитет. Такође, имају значајну улогу у мрежи антиоксидантне заштите (Sen and Packer, 2000).

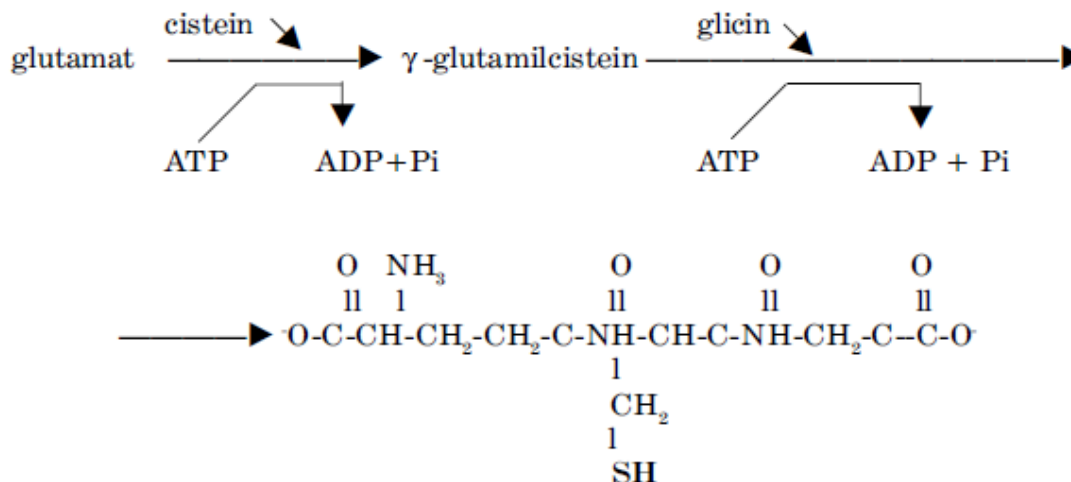
Трипептид  $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин (GSH), најраспрострањенији унутарћелијски тиол, је сулфхидрилни антиоксидант (-SH), антитоксин и ензимски кофактор (Kidd, 1997).

Присутан у свим ћелијама у милимоларним концентрацијама (Meister and Anderson, 1983). GSH се налази у једру, ендоплазматском ретикулуму и митохондријама. У митохондријама се налази 10% укупног GSH, али то је GSH синтетизован у цитосолу јер у митохондријама нема ензима за синтезу глутатиона (Fernandez-Checa *et al*, 1998).

Синтеза и разградња глутатиона одвија се у оквиру  $\gamma$ -глутамил циклуса (Meister-ов циклус) (Meister, 1995). Синтеза GSH се догађа у ћелијама свих органа, а нарочито јетре, путем две ензимски катализоване реакције уз утрошак АТФ-а.



Схема 8. Стварање глутатиона.



Прва реакција, коју катализује  $\gamma$ -глутамил-цистеин синтетаза, укључује кондензацију глутаминске киселине и цистеина у  $\gamma$ -глутамилцистеин. Ограничавајући фактор одвијања ове реакције је расположивост цистеина. Ова аминокиселина нормално настаје из есенцијалне аминокиселине метионина, разградњом протеина из хране или пре преградњом ендогених протеина. Настали  $\gamma$ -глутамилцистеин се уз каталитичко деловање глутатион синтетазе повезује са глицином стварајући глутатион.

Концентрација глутатиона у ћелији је много већа од концентрације цистеина и цистина па је глутатион не само транспортни облик цистеина већ и његов чувар (Ћerelak and Dodig, 2003).

У нормалном редокс стању ћелије скоро сав глутатион је у редукованом облику, GSH, а свега око 1% у оксидованом облику GSSG (глутатион дисулфид) (Dickinson and Forman, 2002). Глутатион може бити ковалентно везан за протеине у процесу званом глутатионизација (Kidd, 1997). GSH је кофактор селено-ензима глутатион пероксидазе (Se GSHPx) и фосфолипид-хидропероксид глутатион-пероксидазе (PH GSHPx), затим глутатион синтетазе (GST), леукотријен С4 синтетазе, 3-дејодиназа, глутаредоксина и гликозилаза (Pompella *et al*, 2003). Електрон донирајуће својство одговорно уа биохемијску активност глутатиона приписује се -SH скупини цистеина (Kehrer and Lund, 1994).

GSH може директно уклањати SR или индиректно као супстрат за GSHPx и GST у процесима детоксификације водоник пероксида, липидних хидропероксида

и електрофилних једињења (Masella *et al*, 2005). Ензими једним именом названи глутатион-трансхидрогеназе користе GSH као кофактор у претварању дехидроаскорбата у аскорбат, рибонуклеотида у деоксирибонуклеотиде и за различите  $-S-S\rightarrow-SH$  интерконверзије (Ћерелак and Dodig, 2003). Тиме глутатион даје допринос обнови оксидованих облика других антиоксиданата и помаже одржавање такозваних антиоксиданаса липидне фазе као што је витамин Е и неки каротеноиди (Ћерелак and Dodig, 2003).

У стању оксидационог стреса, концентрација GSH се брзо смањује, док се потенцијално токсични GSSG повећава што погодује стварању мешаних дисулфида са ћелијским протеинима (протеин-глутатион мешани дисулфиди, протеин-SSG). Ова реакција је важна за дејство GSH у процесу преношења сигнала јер знатан број протеина који учествују у преношењу сигнала има критичне тиоле (нпр рецептори, неке протеин киназе и транскрипциони фактори) и мења своје функције након стварања мешаних дисулфида (Dickinson *et al*, 2002).

Вишак GSSG се може излучити из ћелије и екстрацелуларно деградирати што представља сигнал ћелији за *de novo* синтезу GSH. GSSG се може редуковати у GSH дејством GR, користећи NADPH као редуктанс.

Смањење укупног GSH у ћелији последица је активности и GPx и GST. У реакцији катализованој GPx настаје велика количина GSSG, док у реакцијама које катализује GST, GSH се коњугује са различитим електрофилима, а GSH-адукти се активно излучују из ћелије.

Глутатион је као редуктант врло важан у одржавању стабилности мембране еритроцита (нормалан однос GSH : GSSG у еритроцитима је 100 : 1) (Ћерелак and Dodig, 2003).

Као редуктант, антиоксидант и детоксикант, GSH има важну улогу у одржавању здравља. Смањене концентрације глутатиона повезане су са процесом старења – особе старосне доби 20-40 година имају 17 % већу концентрацију GSH у крви од особа старих 60-80 година (Samiec *et al*, 1998). Смањене концентрације GSH повезане су и са патогенезом различитих болести јетре, плућа, неуродегенеративне болести (Shulz *et al*, 2000 ). Описани су и поремећаји имуног одговора будући да су пролиферација, раст и диференцијација ћелија имуног

система зависно од GSH (Џерелак and Dodig, 2003). Смањење концентрације GSH може довести до различитих поремећаја у организму: може се смањити ниво синтезе протеина укључујући и синтезу DNA (глутатион учествује и у синтези прекурсора протеина и DNA); ћелије у култури доспевају у стање мировања; инхибирана је ћелијска и цитотоксичност зависна од антитела (Uhlig and Wendel, 1992).

Иако неопходан, глутатион сам није довољан да спречи цитотоксично деловање ROS. Његов основни значај је у томе да је неопходан за функционисање GSH-зависних ензима који учествују у првој и другој линији одбране од штетног деловања ROS.

## II

# ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

## 2.1. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

Циљеви студије:

- 1) Утврђивање какве промене реуматоидни артритис изазива на ендотелним ћелијама и њиховој функцији у смислу акутног одговора у регулацији васкуларног тонуса (ефекти на функцију периферног артеријског ендотела)
- 2) Утврђивање какве промене реуматоидни артритис изазива на ендотелним ћелијама и њиховој функцији у смислу хроничног утицаја у смислу регулације структуре артеријског зида (ефекти на структуру каротидне артерије)
- 3) Утврђивање оксидационог статуса код пацијената са реуматоидним артритисом и његов утицај на ендотелну дисфункцију
- 4) Утврђивање повезаности процента дилатације изазаване протоком брахијалне артерије са дебљином зида каротидне артерије
- 5) Међусобне повезаности ових параметара у смислу глобалног одговора кардиоваскуларног система код болесника са реуматоидним артритисом
- 6) Испитивање повезаности циркулишућих маркера ендотелне дисфункције са параметрима запаљења и степеном активности реуматоидног артритиса

Хипотезе студије:

- 1) Делови кардиоваскуларног система код болесника са реуматоидним артритисом паралелно мењају своју функцију и структуру
- 2) Активност реуматоидног артритиса позитивно корелира са повећањем дебљине интима-медија комплекса каротидних артерија
- 3) Активност реуматоидног артритиса позитивно корелира са успореном релаксацијом брахијалне артерије током реактивне хиперемije
- 4) Повишене вредности биохемијских маркера запаљења су могући предиктори развоја атеросклерозе
- 5) Поремећај параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом су корисни у процени кардиоваскуларног ризика код пацијената са реуматоидним артритисом

# III

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ово истраживање је мултидисциплинарно и обухвата опште прихваћене методе физиологије и реуматологије. Испитивање је спроведено у периоду од јануара до јуна 2011. године у Одељењу Реуматологије Клиничког Центра Крагујевац и на Катедри за физиологију, Факултета Медицинских Наука у Крагујевцу. Студија је одобрена од стране Етичког одбора Клиничког Центра Крагујевац 8. 10.2010. Све особе су добровољно пристале да учествују у студију и сви испитаници информисани су о природи, сврси, трајању, очекиваним ефектима и ризицима истраживања, и од њих је добијена писмена сагласност за учешће у студији. Студија је спроведена у складу са принципима Хелсиншке декларације и добре клиничке праксе.

### 3.1. ИСПИТАНИЦИ

У студији је учествовало 52 пацијената са реуматоидним артритисом који испуњавају важеће дијагностичке критеријуме Америчке реуматолошке асоцијације из 1988. године (Arnett *et al*, 1988). Пацијенти су одабирани у Одељењу Реуматологије и Реуматолошкој амбуланти у Клиничком Центру Крагујевац. Просечна старост пацијената је била 52 године (средња вредност 52.46 године,  $SD \pm 7.39$ , min 37 -max 60 године). Дужина трајања болести просечно је износила 7.58 година  $\pm SD 5.94$  (min. 1 – max. 20 година). У време студије, сви пацијенти су употребљавали један или два болест модификујућа лека (БМЛ). Пацијенти који су примали високе дозе кортикостероида ( $> 10$  mg/дневно, укључујући парентералну администрацију) и они који су употребљавали биолошке лекове нису укључени у студију. Нестероидне антиинфламаторни лекове пацијенти су употребљавали повремено.



Реуматолошки преглед је укључивао процену активности болести преко скорa за активност болести 28 (Disease Activity Score -DAS 28). DAS 28 обухвата преглед и процену броја отечених и осетљивих зглобова од укупно 28 зглобова који укључују: проксималне интерфалангеалне зглобове, метакарпалне фалангеалне зглобове, ручје, лактове, рамена и колена; заједно са нивоом седиментације еритроцита (ESR) и визуелном аналогном скалом (VAS). VAS је скала која користи хоризонталну линију од 100 mm где пацијент означи место које означава његов степен бола на линији која лево означава “без бола” (леви крај, 0mm) и “ најјачи бол” (десни крај 100mm). DAS 28 се израчунава аутоматски користећи аутоматски DAS 28 калкулатор (V1.1-beta Alfons and Michel) , који је доступан на интернет адреси [www.umcn.nl](http://www.umcn.nl). DAS 28.

У контролној групи је било 30 испитаника, болничко особље које је било сличних година старости као испитивана група пацијената ( просечна старост 55.23 година  $\pm$  SD 4.232, min. 43–max. 60 година). Расподела по полу је била слична и у групи пацијената и у контролној групи.

Фактори искључења за студију су били исти и за групу пацијената и за контролну групу:

- исхемијске кардиоваскуларне болести,
- повишен крвни притиска,
- шећерна болест,
- активни пушач (задњих 5 година),
- повећане вредности липида у серуму,
- присуство кардиоваскуларних болести у породици,

- рана менопауза код жена.

Клинички преглед је обухватао и антропометријска мерења (телесну висину, телесну масу), мерење вредности крвног притиска. Индекс телесне масе (Body mass index - BMI) је израчунат преко формуле  $\text{телесна маса}/(\text{телесна висина})^2$ .

### **3.2. Ултразвучни преглед - методологија рада**

#### **3.2.1. Одређивање *intima media thickness a. carotis communis***

Преглед каротидних артерија ултразвуком је обављао испитивач на ултразвучном апарату Acuson 128XP (Siemens, Germany) са сондом од 7 MHz. Испитаници су током прегледа лежали на леђима, са вратом у екстензији и главом заротираном до 45° на лево и на десно. Ултразвучни преглед је обухватао леву и десну заједничку каротидну артерију, дистално од места рачвања 1 центиметар. Свим испитаницима је мерена дебљина зида обе заједничке каротидне артерије на одређеном дисталном сегменту и мерење је вршено на слици ултразвучног апарата помоћу електронског калипера. Од свих мерења сваке пројекције за израчунавање је узимана максимална вредност. Вредности дебљине зида леве и десне каротидне артерије за три различите пројекције је израчуната сабирањем и подељено са три. Резултати дебљине зида каротидне артерије за сваког испитаника изражено је у милиметрима (Henperici, 2000). Сва мерења је обављао један испитивач, који није био упознат са другим клиничким карактеристикама испитаника. Од недавно је једна студија је закључила да вредност дебљине зида каротидне артерије веће од 0.90 mm предвиђа развој кардиоваскуларног догађаја код пацијената са РА (Gonzalez-Juanatey *et al*, 2009) и да је вредност каротидног ИМТ веће од 0.90 mm може сматрати индексом субклиничке атеросклерозе (Espeland, 1994), ми смо

испитанике поделили у две групе према вредностима каротидне ИМТ веће од 0.90 mm и мање или једнако 0.9 mm. Вредност ИМТ>0.9 mm сматра се индексом субклиничке атеросклерозе.

### 3.2.2.Одређивање ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије

Преглед a.brachialis васкуларном сондом од 7.5MHz са подешеном дужином до 30 mm, трансмит зоном на предњи зид, углом доплерског курсора до 70 степени, оптималним „gain-ом“и у просторији са оптималним спољашњим условима (температура 22-24 степен Целзијуса), изводи се постављањем сонде на дистални унутрашњи део леве надлактице, непосредно изнад кубиталне јаме. Ради прецизности и поузданости мерења, неопходно је мерење вршити увек на истом дела a.brachialis и из истог положаја, тако да сонду идеално позиционирати у дати положај током читавог прегледа или на одређени начин обележити место позиционирања. После добијања коректне дводимензионалне слике уз помоћ Color-Doppler-а, зумирањем и преласком у М-мод стичу се услови за мерење унутрашњих дијаметара и то енд-дијастолни (минимални) и пеак-сistolни (максимални), а после позиционирања курсора пулсним Doppler-ом се добија кривуља протока кроз испитивану артерију. Каснијом компјутерском анализом ове кривуље могуће је одредити бројне параметре: максималну брзину протока, средњу брзину протока, минималну брзину протока, итд. Протоколи мерења дијаметара и снимања протока понављани су код испитаника у разним условима, најпре базним, током исхемије(само мерење дијаметра) и током реактивне хиперемije (ендотел-зависна дилатација). После мерења у базалним условима a.brachialis је оклудирана

манжетном тензиометра постављеном у проксималном делу надлактице и напумпаном до 50 mm Hg изнад систолног притиска у трајању од 5 минута. Непосредно по попуштању манжетне у више наврата су нрегистровани крвни проток и дијаметри a.brachialis, снимани су и каснијом анализом за даље прорачуне као валидне узимане оне које су регистроване у периоду од 5-10 секунде за реак-протока, а измђеу 60-90 секунде за реак-дијаметар после отпуштања манжетне.

### 3.3.Биохемијске анализе

Пункција вене је обављена код испитаника који седе. Сви узорци су послати у Централну лабораторију Клиничког Центра Крагујевац и процесуирани су у оквиру 4 сата од венепункције. Испитаници су замољени да гладују 12 сати пре вађења крви. Свим испитаницима је узимана крв непосредно пре ултразвучног мерења. Ниво седиментације еритроцита (Erythrocyte sedimentation rate - ESR) је одређивана методом по Westergreen-у а С-реактивни протеин је одређиван нефелометријски. Реуматоидни фактор у серуму је одређиван техником латекс аглутинације. Присуство антитела на циклични цитрулисани пептид у серуму детектовали смо помоћу EIA (Immunoscan, Roche, COBAS,The Switzerland) у складу са препорукама произвођача. Титар испод 17 јединица се сматра негативним. Укупни холестерол, фракције холестерола липопротеини ниске и високе густине су одређивани (HDL, LDL) лабораторијским ензимским китом (Roche Pharmaceuticals).

#### 3.3.1.Одређивање антигена за Фон Вилебрандов фактора (vWFАg)

За одређивање антигена за von Willebrandov faktor (vWFАg) је коришћен латекс имуноесеј за квантитативно одређивање vWFАg у хуманој плазми, на

апарату ACL Elite Pro апарату (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, 01730-2443, USA). Кит за одређивање vWF<sub>Ag</sub> се састоји из: 1) латекс реагенса (Nr.Cat.0020002310):2 бочице x 3ml суспензије поликлонских антитела зеца (на vWF<sub>Ag</sub>) обложених полистиренским латекс честицама, са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. 2) реакционог пуфера (Nr.Cat.0020002320) :и 2 бочице x 4ml HEPES пуфера са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. Метода се заснива на аглутинацији латекс честица у присуству vWF<sub>Ag</sub>. Степен аглутинације је директно пропорционалан концентрацији vWF<sub>Ag</sub>-а у узорку плазме и одређује се мерењем смањења количине светлости које ослобађају створени агрегати.

### **3.3.2.Одређивање активности фон Вилебрандовог фактора (vWF<sub>Act</sub>)**

За одређивање активности von Willebrand-ovog faktora (vWF<sub>Act</sub>) је коришћен латекс имуноесеј за квантитативно одређивање vWF<sub>Act</sub> у хуманој плазми, на апарату ACL Elite Pro апарату (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, 01730-2443, USA). Кит за одређивање vWF<sub>Act</sub> се састоји из 1) латекс реагенса (Nr.Cat.0020004710):2 бочице x 4,5ml суспензије лиофилизованих пречишћених моноклонских антитела миша (на функционални епитоп vWF-a) обложених полистиренским латекс честицама са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора 2)пуфера (Nr.Cat.0020004720): 2 бочице x 4,5ml Tris пуфера са додатком говеђег серумског албумина и стабилизатора. Метода се заснива на мерењу пораста замућености која настаје као последица аглутинације латекс реагенса. Специфична моноклонска анти-vWF антитела , адсорбована за латекс

реагенс реагују са vWF плазме. Степен аглутинације је директно пропорционалан активности vWF-а у узорку плазме, и одређује се мерењем снижења количине светлости које ослобађају створени агрегати.

vWfAct и vWfAg резултати су формулисани као одређен процента од нормалних референтних вредности и урађени су у Лабораторији за хематологију Интерне клинике КЦ Крагујевац.

### 3.3.3. Одређивање параметара оксидационог стреса

Да би се избегли утицаји исхране на анализе крви саветовано је испитаницима да се пре узимања узорака крви придржавају дијете без сухомеснатих производа, сирева, рибе, биљних или црних чајева, пива, вина и других алкохолних пића (Choi, 2003). Узорци венске крви (4.5 ml) испитаницима су узети у време студије. Крв је узимана у вакумске епрувете са цитратом, а основна обрада узорака се састојала се од одвајања еритроцита од плазме центрифугирањем (10 min на 5000 rpm, 4 °C). Исталожени еритроцити су ресуспендовани и три пута испрани физиолошким раствором уз центрифугирање 10 min на 5000 rpm, а затим замрзнути на -20 °C до анализе.

Анализа биохемијских параметара ендотелне функције и параметара повезаних са акутним и хроничним ефектима оксидационог стреса: ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $NO^{\cdot}$ , TBARS, SOD, CAT, GSH) одрађена је у Лабораторији за кардиоваскуларну физиологију на Медицинском факултету у Крагујевцу. Мерење је вршено на спектрофотометру *Analytic Jena Specord S 600*.

#### 3.3.3.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ )

Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у плазми заснива се на реакцији  $O_2^{\cdot-}$  са нитро тетразолијум плавим (Nitro Blue Tetrazolium - NBT) до нитроформазан плавог (Auclair and Voisin, 1985). Мерење се врши на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{max}=550$  nm. Есејна смеша ("assay mixture") садржи: 50 mM TRIS-HCl пуфера (pH = 8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml

желатина и 0.1 mM NBT. Пре употребе раствор се претходно гасира азотом под притиском у трајању од једног часа.

У епрувете (12 x 100) пипетира се 50  $\mu$ l плазме и 950  $\mu$ l есејне смеше, чиме реакција отпочиње. Као слепа проба уместо плазме користи се адекватна количина дестиловане воде. На самом почетку реакције измери се екстинкција смеше и нотира се као екстинкција  $E_1$ . 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  $E_2$ . Исти поступак се примењује и за слепу пробу.

Концентрација ослобођеног  $O_2^{\cdot-}$  добија се на основу следећих једначина:

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

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

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

$$\text{nmol } O_2^{\cdot-}/\text{ml плазме} = \Delta E / 0.015 \times 1/0.05$$

### 3.3.3.2. Одређивање концентрације водоник пероксида ( $H_2O_2$ )

Детерминација количине водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) заснива се на оксидацији фенол-црвеног помоћу водоник пероксида, реакцијом која је катализована ензимом пероксидазом из коњске ротквице (Horse Radish Peroxidase – HRPO) (Pick and Keisari, 1980). Ова реакција резултује формирањем једињења чији је максимум апсорпције на  $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$ . Линеарна зависност апсорбанце на 610 nm од концентрације  $H_2O_2$  је постојана за 1 - 60 mM опсег концентрација (1 – 60 nmol/ml).

Ова метода омогућује детерминацију настајања и ослобађања  $H_2O_2$  за временски интервал од 5 - 60 минута. У епрувете (12 x 100) се пипетира 200 ml плазме и 800 ml свеже направљеног раствора фенол црвеног (Phenol Red Solution – PRS) који садржи 140 mM NaCl, 10 mM калијум фосфатног пуфера (pH = 7), 5.5 mM D(+)-глукозе и 0.28 mM фенол-црвеног. Узорцима се затим дода 10 ml (1 : 20) HRPO, припремљен *ex tempore*. Узорци се остављају на собној температури 10

минута, а затим се подеси рН > 12, помоћу 1 М NaOH. Као слепа проба плазме користи се адекватна количина дестиловане воде.

Концентрација ослобођеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у венској крви израчунава се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни (Stock) раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, уз претходну проверу концентрације (A230 за 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> износи 0.810). У три епрувете пипетира се, уместо плазме, 5, 10 и 20 ml 1 mM раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 200 ml дестиловане воде, 800 ml раствора фенол-црвеног и 10 ml (1 : 20) HRPO. Након инкубације од 10 минута на собној температури, подеси се ј рН>12, помоћу 1М NaOH (10ml).

Концентрација, а затим и количина ослобођеног H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у венском ефлуенту израчунава се на основу фактора апсорбанце (F)/nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

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

На основу апсорбанце узорка (A<sub>u</sub>) на λ<sub>max</sub> = 610nm и њеног упоређивања са слепом пробом (A<sub>sp</sub>) израчунава се финална апсорбанца (DA) (A = A<sub>u</sub> - A<sub>sp</sub>). Помоћу овако добијене апсорбанце, фактора F и количине венског ефлуента употребљеног у есеју (200 ml) израчунава се концентрација и количина H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у плазми по формули:

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

### 3.3.3.3. Одређивање индекса липидне пероксидације (TBARS)

Индекс липидне пероксидације, као један од параметара оксидативног стреса, одређује се индиректно преко продукта реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, одакле и потиче скраћеница TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances – TBARS). За одређивање концентрације TBARS у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у *Eppendorf* епрувете пиретира се 0.4 ml 28 % TCA и 0.8 ml плазме. Тако добијени узорци се инкубирају у леденом куратилу (-4 °C) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугурају 4 минута на 15000 rpm, а у добијеном супернатанту одређује се концентрација TBARS спектрофотометријски (Ohkawa *et al*, 1979). Метода се заснива на



одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (ТВА).

У епрувете (12 x 100) пиретира се 800  $\mu$ l екстракта плазме и 200  $\mu$ l 1% ТВА и 0.05 М NaOH. Као слепа проба уместо екстракта плазме користи се еквивалентна количина дестиловане воде. Након пиретирања, узорци се инкубирају у воденом куратилу 15 минута на 100 °C. Након инкубације, узорци се прилагоде собној температури, па се приступа детерминисању концентрације ослобођених TBARS спектрофотометријски на таласној дужини од  $\lambda = 530$  nm.

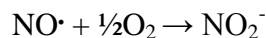
Концентрација ослобођених TBARS добија се на основу следеће једначине  
$$\text{nmol TBARS/ml плазме} = \Delta A (A_u - A_{sp}) / 1.56 \times 1.25$$

при чему је  $A_u$  арсорбанца узорка, док је  $A_{sp}$  арсорбанца слепе пробе, док су 1.56 и 1.25 корекциони фактори за овај есеј.

#### 3.3.3.4. Одређивање концентрације азот монооксида (NO•)

За одређивање концентрације нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у плазми врши се специфична екстракција по следећем протоколу: у *Eppendorf* епрувете пипетира се 0.1 ml 3 М PCA, 0.4 ml 20 mM EDTA и 0.2 ml плазме. Тако добијени узорци инкубирају се у леденом куратилу (-4 °C) 10 минута. Након инкубације узорци се центрифугурају 4 минута на 15000 rpm, супернатант се одлива, а преципитат ресуспендује у 2 М  $\text{K}_2\text{CO}_3$  до pH = 7.4.

У тако добијеним узорцима екстракта плазме одређује се концентрација ослобођених нитрита спектрофотометријском реакцијом уз употребу Griess-овог реагенса (Green *et al.*, 1982). С обзиром да се у реакцији са молекуларним кисеоником:



ствара еквимоларна количина нитрита, можемо са веома великом сигурношћу тврдити да количина ослобођених нитрита представља количину ослобођеног NO•.

Биохемијски се ова метода заснива на употреби Griess-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс, који даје 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.

У епрувете (12 x 100) пипетира се 0.1 ml екстракта плазме, 250 µl свеже направљеног Griess-ов реагенса и 125 µl амонијачног пуфера (pH = 9.0), кога сачињавају амонијум хлорид (NH<sub>4</sub>Cl) и натријум тетраборат (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>). Амонијачни пуфер, који се у току припреме мора загревати, због изузетно слабе растворљивости натријум тетрабората, има за сврху стабилизацију диазо-комплекса. Као слепа проба екстракта плазме користи се дестилована вода. Концентрација ослобођених нитрита у узорцима одређује се на основу калибрационе криве. Калибрациона крива конструише се на основу екстинкција узорака, који у себи садрже познату концентрацију нитрита, након њихове реакције са Griess-овим реагенсом у присуству пуфера. Добија се пипетирањем различитих количина воденог раствора 1 mM NaNO<sub>2</sub> у 1 ml дестиловане воде и то: 3, 6, 12, 24µl, чиме се добија одређена концентрација нитрита. Након стабилизације боје на собној температури 5 - 10 минута приступа се детерминисању концентрације ослобођених нитрита спектрофотометријски на таласној дужини од λ = 550nm. Концентрација, а затим количина ослобођених нитрита, добија се на основу одређивања стандардног фактора (F):

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

за сваки појединачни стандард (F1 - F4), а затим добијањем њихове аритметичке средине. Затим се разлика екстинкција узорка и слепе пробе подели са стандардом (F):

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

### 3.3.3.5. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Одређивање активности SOD врши се адреналинском методом. Ова метода припада групи метода "негативног" типа, јер се прати смањење брзине

аутооксидације адреналина у алкалној средини, која је зависна од  $O_2^{\cdot-}$ . (Misra and Fridovich, 1972). Присутна SOD уклања  $O_2^{\cdot-}$  и при томе инхибира реакцију аутооксидације адреналина. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на 480 nm. Пораст апсорбанце на 480 nm потиче од акумулације аденохрома. Брзина аутооксидације адреналина једнака је нагибу линеарног дела пораста апсорпције. Процент инхибиције користи се као мера каталитичке активности ензима. Брзина аутооксидације адреналина у одсуству ензима узима се као референтна (контролна), а брзина аутооксидације у присуству SOD, односно протеина у цитосолу представља део референтне вредности.

У 3.2 ml реакционе смеше коју чине: 3 ml карбонатног руфера, рН = 10.2 и 0.1 ml раствора адреналина, додаје се 0.01 ml раније припремљеног супернатанта. Аутооксидација адреналина прати се у току 4 минута на 480 nm. Реакција је стабилна у температурном опсегу од 26 - 30<sup>0</sup>С. Упоредо се ради и контролна реакција. Процент инхибиције аутооксидације адреналина у присуству SOD из узорка, у односу на контролну реакцију аутооксидације адреналина користи се за израчунавање SOD активности. Количина SOD изражена је у јединицама SOD активности по граму Hb (јед/gHb). Јединица SOD активности дефинисана је као запремина, односно количина протеина која узрокује 50 % инхибиције брзине аутооксидације адреналина у линеарном делу пораста апсорпције.

Израчунавање се врши по следећој једначини:

$$SOD-1 = \frac{2(\Delta K - \Delta A) \times R}{V \times Hb \times \Delta K}$$

при чему је:

$\Delta K$  - промена апсорпције контролне реакције у минути

$\Delta A$  - промена апсорпције реакције са узорком у минути

V - запремина узорка која се сипа у реакциону смешу (ml)

Hb - количина хемоглобина (g/100ml лизата)

R - разблажење

## 3.3.3.6. Одређивање активности каталазе (CAT)

Активност каталазе у сонификату одређује се по методи *Beutler*-а (1982). Метода се састоји у спектрофотометријском праћењу брзине разградње водоник-пероксида у присуству каталазе на 230 nm. На тој таласној дужини водоник пероксид апсорбује светлост. Тачна концентрација водоник-пероксида одређује се на следећи начин: у односу на апсорпцију разблаженог раствора пуфера (1 : 10), као нула, читава се апсорпција раствора састављеног од 0.9 ml разблаженог пуфера и 0.1 ml разблаженог 30 % раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 : 100). Концентрација водоник пероксида израчунава се на основу екстинкционог коефицијента, који је за H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, на 230 nm, 0.071, по формули:

$$C = \frac{\Delta A}{0.071}$$

Добијена концентрација затим се разблажује до 10 mM. Реакциона смеша:

У кварцну кивету у којој се налази 50  $\mu$ l пуфера додаје се између 5 и 50  $\mu$ l узорка (зависно од активности каталазе). Реакција почиње додатком 1 ml 10 mM раствора водоник-пероксида. Пад апсорбанце прати се на 230 nm у току 3 минута. Активност се изражава у јед/mg протеина, а јединица је дефинисана као количина редукованог H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, изражена у  $\mu$ M, у минути. Израчунавање се врши према следећој једначини:

$$CAT = \frac{\Delta A \cdot R}{0,071 \cdot Low \cdot V}$$

при чему је:

$\Delta A$  – промена апсорбанце у минути

R – разблажење

V – запремина узорка (ml)

Low – количина протеина (mg/ml сонификата).

**3.3.3.7. Одређивање активности глутатиона (GSH)**

Ниво редукованог глутатиона (GSH) у плазми одређује се спектрофотометријски по методи *Beutler*-а (1982), а заснива се на оксидацији глутатиона GSH помоћу 5,5–дитио-бис-6,2-нитробензевом киселином (DTNB). GSH се екстрахује тако што се у 0.1 ml 0.1 % EDTA дода 0.4 ml плазме и 0.75 ml раствора за преципитацију (1.67 g метафосфорне киселине, 0.2 g EDTA, 30 g NaCl, допунити до 100 ml дестилованом водом; раствор је стабилан 3 недеље на +4 °C). После мешања на Vortex-мешалици, смеша се екстрахује 15 минута на леду и центрифугира 10 минута на 4000 rpm. Мерење се врши у кварцним киветама запремине 1 ml. У епрувете (12 x 100) пипетира се 300 µl венског ефлуента, 750 µl Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 100 µl DTNB (1 mg DTNB/ml 1 % натријум цитрата). Као слепа проба користи се дестилована вода. Концентрација, а затим и количина редукованог глутатиона у венском ефлуенту одређује се на основу калибрационог дијаграма (стандардне криве), који се одређује за сваки есеј. За конструкцију стандардне криве користи се стандардни Stock-раствор редукованог глутатиона концентрације 1.5 mmol/l. У 4 епрувете се пипетира (уместо венског ефлуента) 10, 20, 30 и 40 µl 1 mM раствора GSH, 300 µl хладног перфузионог *Krebs-Hensenleit*-овог раствора. Тако се одреди концентрација нитрита у узорцима стандарда (nmol/GSH/ml). Мерење апсорбанце (A) врши се на таласној дужини максималне апсорпције  $\lambda_{\max} = 420$  nm. Од добијених апсорбанци одузима се вредност апсорбанце слепе пробе (B), чиме се добија коначна апсорбанца ( $\Delta A$ ). Помоћу овако добијене апсорбанце, стандардног фактора (F), и количине венског ефлуента употребљеног у есеју израчунава се концентрација глутатиона у венском ефлуенту по формули:

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

$$F = \frac{\Delta A}{\text{nmol GSH / curv}}$$

### 3.4. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података рађена је у статистичком пакету *SPSS 10.0 for Windows*.

За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћене су методе дескриптивне статистике: мере централне тенденције (средња вредност, медијана), мере варијабилитета (стандардна девијација, минимум и максимум), као и графичко и табеларно приказивање.

За испитивање нормалности расподеле параметара коришћен је *Kolmogorov-Smirnov test* и *Shapiro-Wilk test*.

У зависности од расподеле, за анализу података коришћени су одговарајући параметријски или непараметријски тестови. Тестирање значајности статистичке разлике између група вршено је *T-тестом* за два независна узорка, односно *Mann Whitney* тестом. За тестирање разлике између два мерења коришћен је *Упарени t-тест*, односно *Wilcoxon*-ов тест. За упоређивање аритметичке средине неког обележја више од две порулације коришћен је *ANOVA* или *Kruskal Wallis* тест. За тестирање зависности два обележја користишћен је  $\chi^2$ -*test*. За анализу међусобне корелације параметара коришћене су методе линеарне регресије и корелације. За мерење јачине линеарне везе између обележја коришћен је *Pearson*-ов или *Spearman*-ов коефицијент корелације.

## IV

# РЕЗУЛТАТИ

#### 4.1. Поређење параметара и разлика између групе пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе

##### 4.1.1. Клинички и демографски параметри код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе

Табела 1.

Параметри	Пацијенти(n=52)	Контрола (n=30)	p
Године старости ( $X \pm SD$ )	52.46±7.39	54.23±5.23	НС
Пол - мушкарац/жена (%)	36.5/63.5	36.8/63.2	НС
Активни/бивши/не пушачи (%)	0/25/75	0/10/90	НС
ВМI ( $\text{kg/m}^2$ )	23.60±1.80	23.79±1.00	НС
Систолни крвни притисак (mmHg)	120,67±8,80	121,33±8,19	НС
Дијастолни крвни притисак (mmHg)	72,21±8,31	70,83±7,67	НС

Вредности су изражене у средњој вредности и стандардној девијацији ( $X \pm SD$ ) или процентима (%). НС, није статистички значајно; ВМI, индекс телесне масе;

Анализом година старости, дистрибуције пола, животних навика, ВМI и вредности крвног притиска није убило статистички значајне разлике између групе пацијената са реуматоидним артритисом и здраве контролне групе (Mann Whitney U test) (Табела 1).



#### 4.1.2. Лабораторијски параметри код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе

Табела 2.

Параметри	Пацијенти (n=52)	Контрола (n=30)	р
Укупни холестерол (mmol/L)	4,77±0,42	4,61±0,42	НС
Липопротеини високе густине (mmol/L)	1,05±0,27	1,20±0,35	<b>p = 0.033</b>
Липопротеин ниске густине (mmol/L)	3.51±0.51	3.15±0.61	<b>p = 0.005</b>
Укупни холестерол/ Липопротеини високе густине	4.80±1.34	4.18±1.49	НС
Триглицериди (mmol/L)	1,26±0,36	1,10±0.31	НС
Глукоза (mmol/L)	4,72±0,25	4,66±0,32	НС

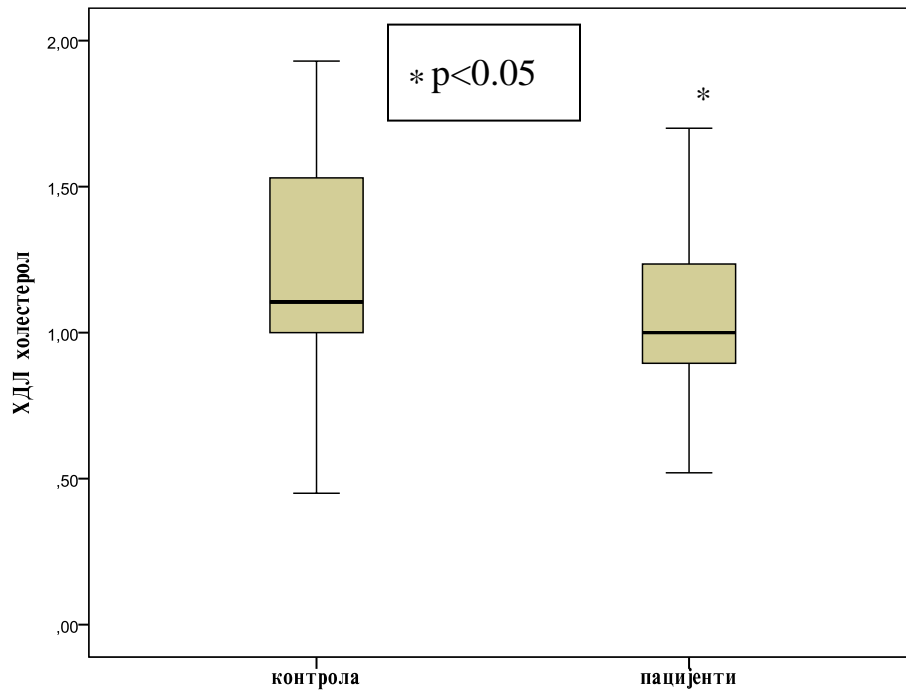
Вредности су изражене у средњој вредности и стандардној девијацији ( $X \pm SD$ ); НС, није статистички значајно

Поређењем лабораторијских параметара између групе пацијената и контролне групе здравих испитаника уочена је статистички значајна разлике у фракцијама холестерола (Табела 2).

Статистички значајно више вредности липопротеина ниске густине су имали пацијенти са реуматоидним артритисом (Mann Whitney U test;  $p = 0.005$ ) (Графикон 1), док су здрави испитаници имали статистички веће вредности липопротеина високе густине (Mann Whitney U test;  $p = 0.033$ ) (Графикон 2).

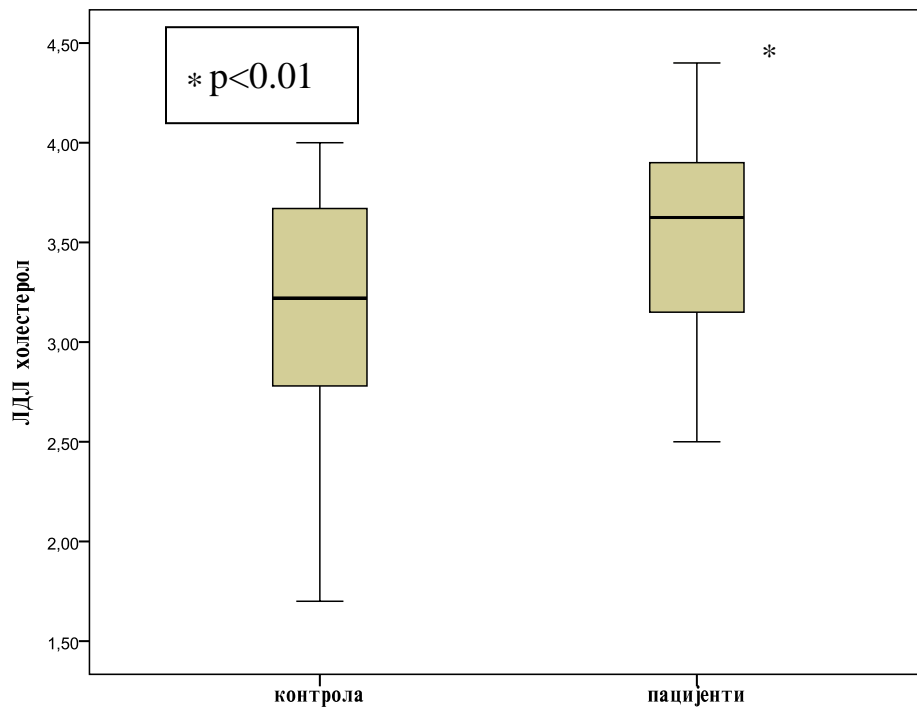
Вредности свих фракција холестерола су се кретала у референтним вредностима лабораторијског стандарда.

Графикон 1. ХДЛ холестерол између пацијената и здравих испитаника



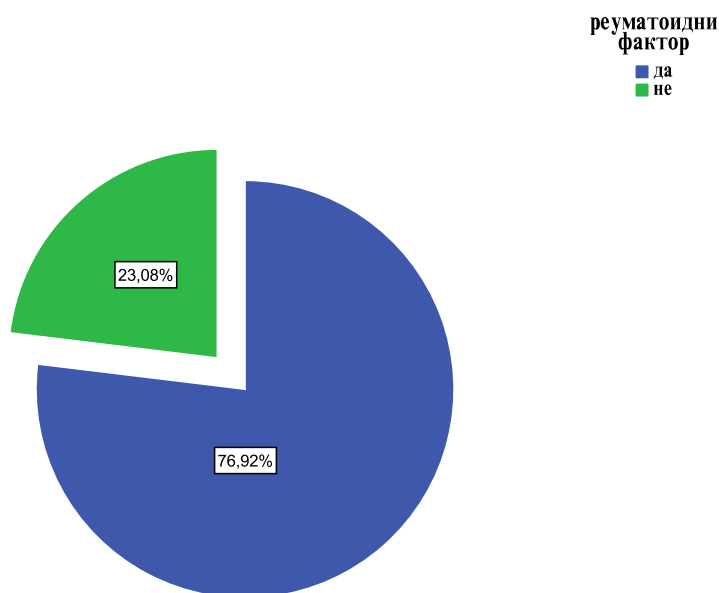
$p = 0.033$

Графикон 2. ЛДЛ холестерол између пацијената и контролне групе



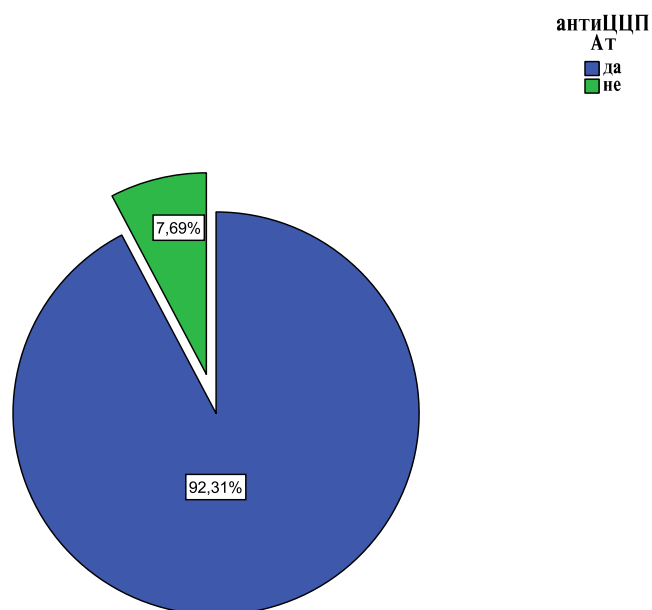
$p = 0.005$

**Дијаграм 1.** Процент позитивног реума фактора код пацијената са реуматоидним артритисом



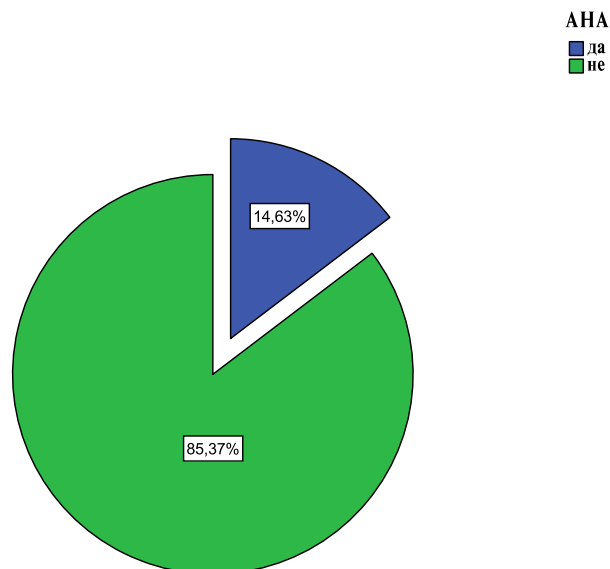
Код пацијената са РА скоро 77% је имало позитиван реуматоидни фактор у серуму (Дијаграм 1).

**Дијаграм 2.** Процент пацијената са реуматоидним артритисом који имају антитела на циклични цитрулисани пептид (антиЦЦП Ат)



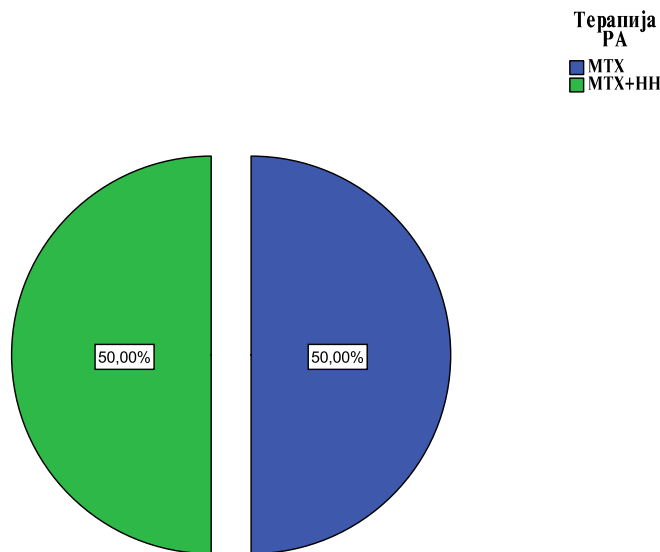
Код пацијената са реуматоидним артритисом 92% је имало позитивна антитела на ЦЦП(Дијаграм 2).

**Дијаграм 3.** Процент пацијената са реуматоидним артритисом који имају позитивна антинуклеусна антитела (АНА)



15% пацијената са РА су имали позитивна антинуклеусна антитела (Дијаграм 3).

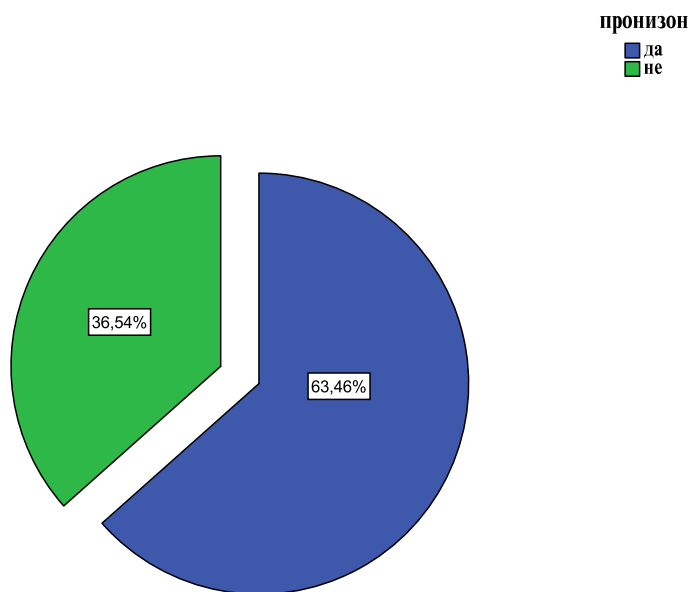
**Дијаграм 4.** Терапија пацијената са реуматоидним артритисом



MTX; methotrexat, HH; Hidroxychlorochin phosphat.

Код пацијената са реуматоидним артритисом 50% је узимало као базичну терапију мнотерапију MTX а половина двојну терапију MTX и Хидроксихлорохин фосфат (Дијаграм 4).

Дијаграм 5. Процент пацијената са реуматоидним артритисом који су у терапији узимали кортикостероиде



Преко половине пацијената са РА је узимало континуирано у терапији мале дозе кортикостероида (Дијаграм 5).

### 4.1.3. Маркери запаљења и ендотелне активације код пацијената са РА и контролне здраве групе сличних година старости и пола

Табела 3.

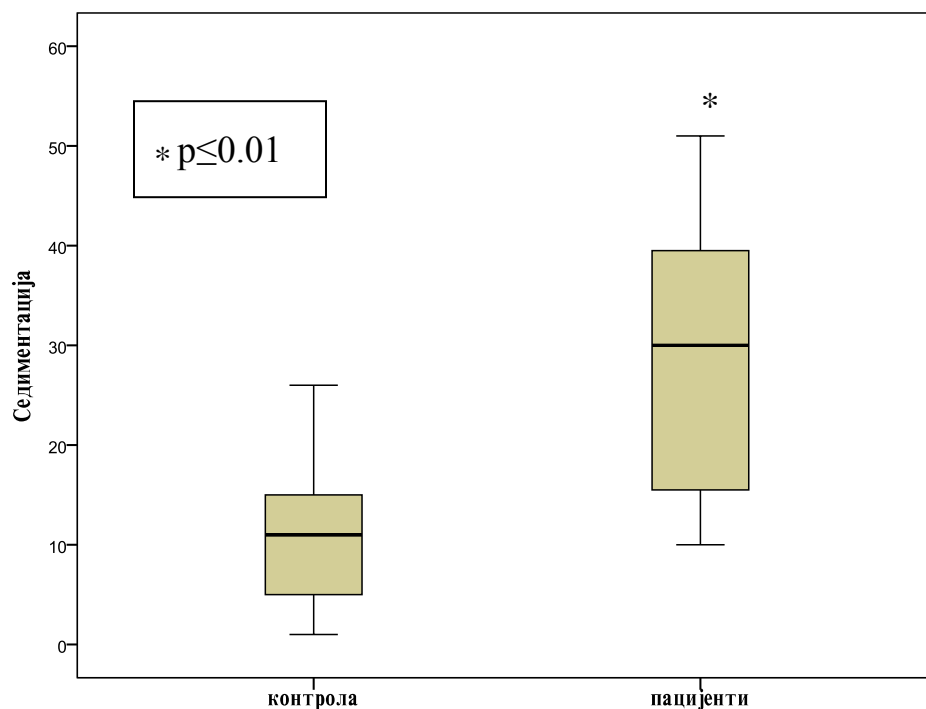
	Пацијенти (n = 52)	Контрола (n = 30)	p вредност
SE,mm/h	28,73±12,08	10,93±6,26	<b>p = 0.000</b>
CRP, mg/l	11.03±8.99	4.49±2.00	<b>p = 0.000</b>
Фибриноген (g/l)	4.38±0.93	3.91±0.93	<b>p = 0.030</b>
DAS 28	3.69±0.84	-	-
HAQ	0.58±0.61	-	-
vWf Ag, %	178,04 ± 61,00	129,36 ± 37,52	p = 0.100
vWf Act, %	144,78 ± 64,03	124,68 ± 36,37	<b>p = 0.010</b>

SE, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин; DAS 28, Индекс активности болести 28; HAQ, Упитник за процену здравственог стања; vWF Ag, von Willebrand фактор антиген ; vWF Act, von Willebrand фактор активност;

Анализом маркера запаљења и ендотелне дисфункције уочава се статистички значајно веће вредности код групе пацијената у односу на контролну здраву групу (Mann Whitney U test) (Табела 3).

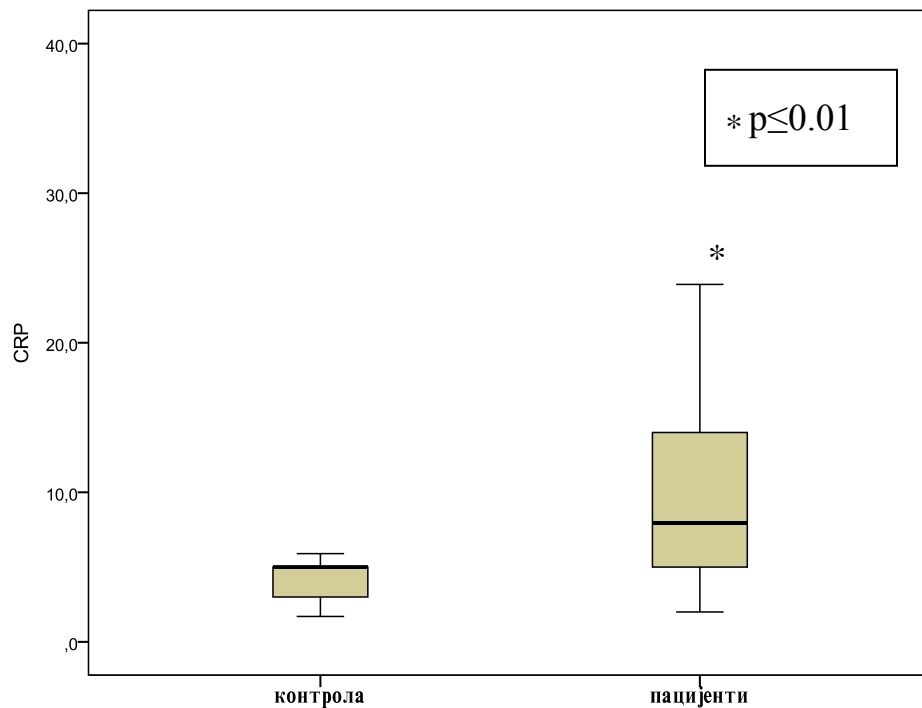
У односу на вредности седиментације еритроцита ( $p = 0.000$ ) (Графикон 3), Ц-реактивног протеина ( $p = 0.000$ ) (Графикон 4), фибриноген ( $p = 0.030$ ) (Графикон 5). Анализом маркера ендотелне активације vWf антигена није било значајне статистичке разлике ( $p = 0.100$ ) (Графикон 6), док је поређење активности vWf показало статистички веће вредности у групи пацијената ( $p = 0.010$ ) (Графикон 7).

**Графикон 3.** Вредности седиментације између пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе



Пацијенти са реуматоидним артритисом су имали статистички значајно већу вредност седиментације ( $28,73 \pm 12,08$ ) у односу на контролну групу ( $10,93 \pm 6,26$ ) ( $p = 0.030$ ) Mann Whitney U test

Графикон 3. Вредности Ц-реактивног протеина између пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе

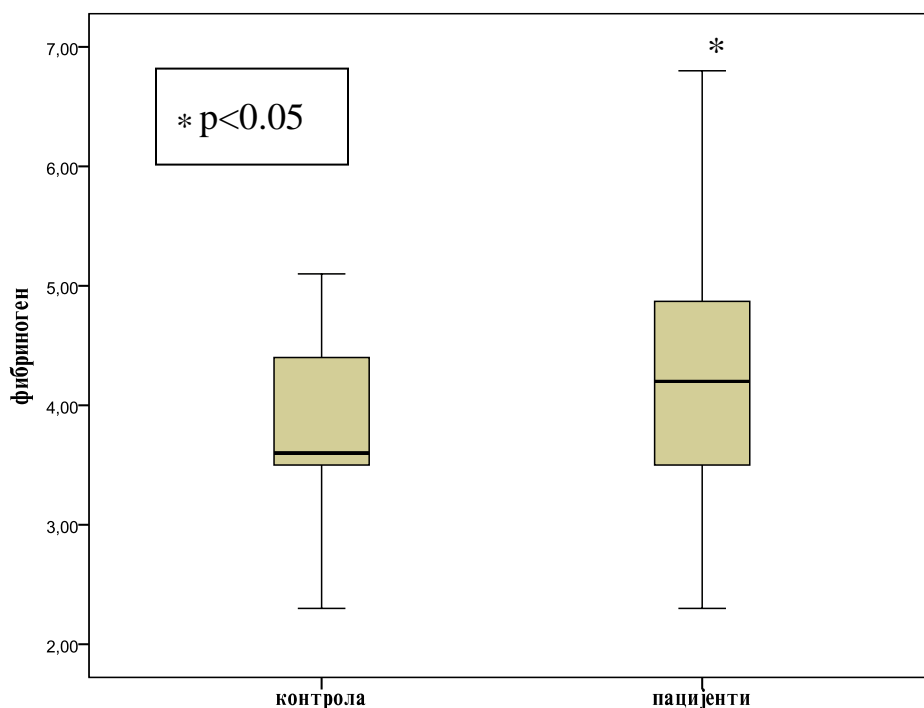


Пацијенти са реуматоидним артритисом су имали статистички значајно већу вредност Ц реактивног протеина ( $11.03 \pm 8.99$  mg/l) у односу на контролну групу ( $4.49 \pm 2.00$  mg/l) ( $p = 0.000$ ) (Mann Whitney U test).



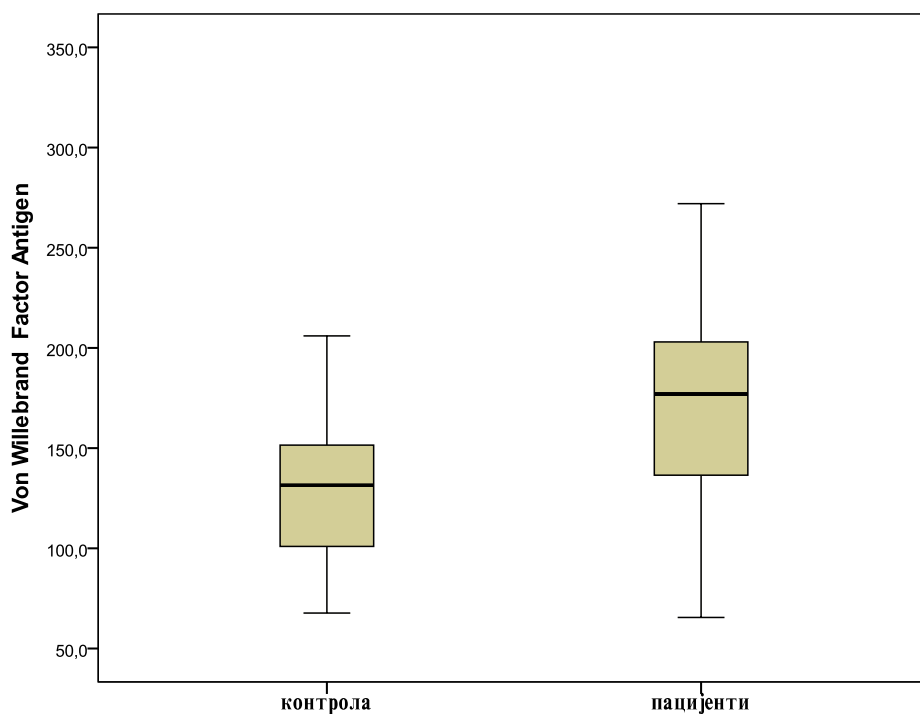
**Графикон 5.** Вредности фибриногена код пацијената са РА и контролне групе

(Вредност је изражена преко средње вредности  $\pm$  стандарна девијација)



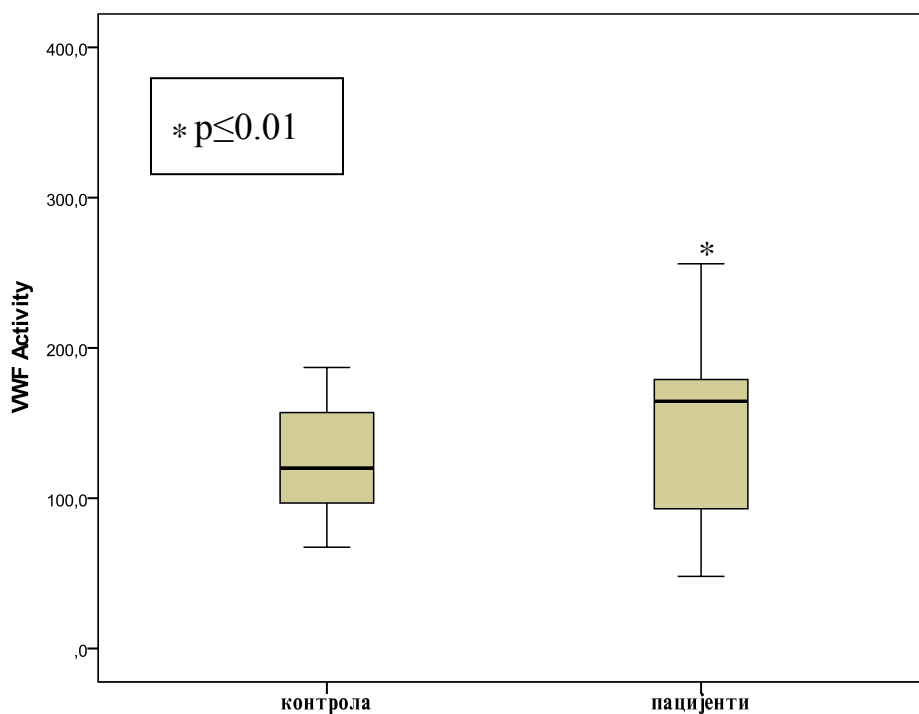
Пацијенти са реуматоидним артритисом су имали статистички значајно већу вредност фибриногена ( $4.38 \pm 0.93, \text{g/l}$ ) у односу на контролну групу ( $3.91 \pm 0.93 \text{ g/l}$ ) ( $p = 0.030$ ) (Mann Whitney U test).

**Графикон 6.** Вредности антигена за фон Вилебрандов фактор између пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе (Вредност је изражена преко средње вредности  $\pm$  стандарна девијација)



Пацијенти са реуматоидним артритисом нису имали статистички значајно већу вредност антигена за фон Вилебрандов фактор у серуму ( $178,04 \pm 61,00, \%$ ) у односу на контролну групу ( $129,36 \pm 37,52, \%$ ) ( $p = 0.100$ ). Mann Whitney U test

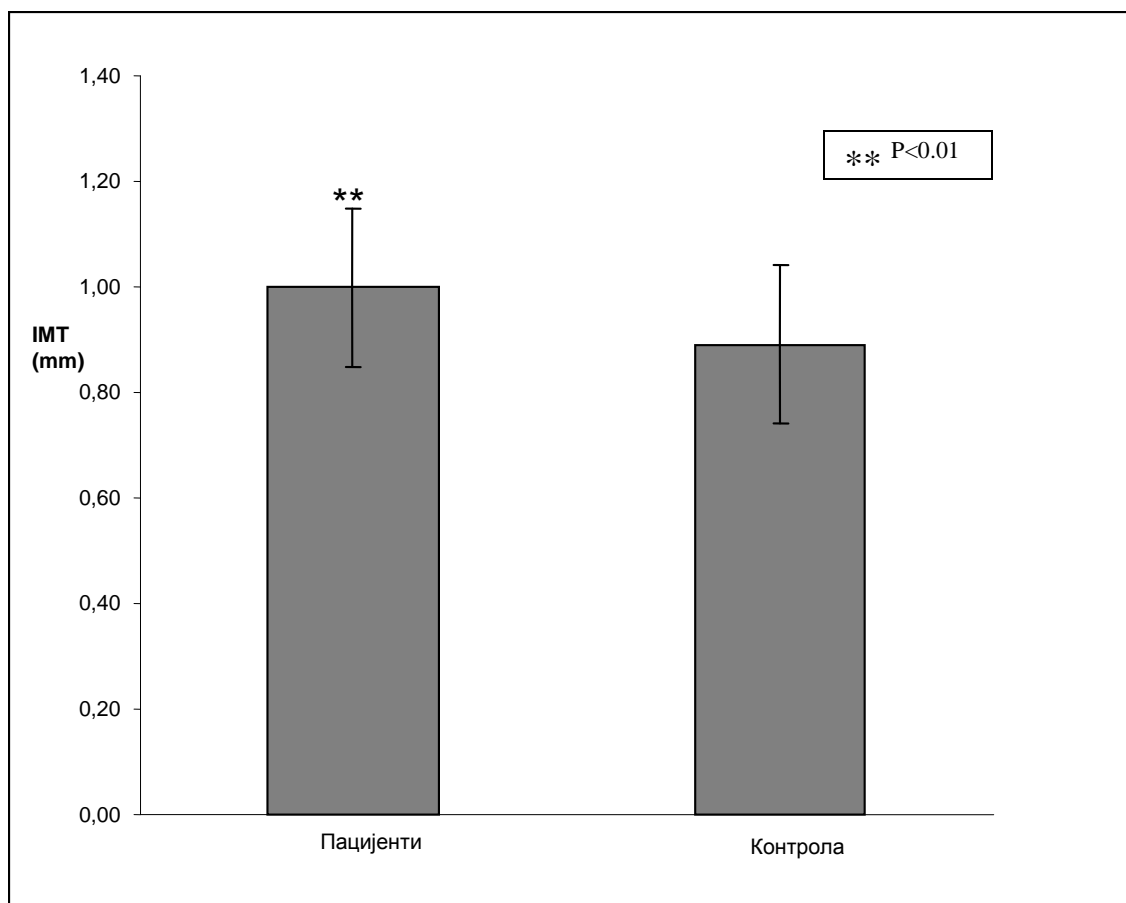
**Графикон 7.** Вредности активности фон Вилебранд фактора између пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе (Вредност је изражена преко средње вредности  $\pm$  стандарна девијација)



Пацијенти са реуматоидним артритисом су имали статистички значајно већу вредност активности фон Вилебрандовога фактор у серуму ( $144,78 \pm 64,03$  , %) у односу на контролну групу ( $124,68 \pm 36,37, \%$ ) ( $p = 0.010$ )(Mann Whitney U test).

#### 4.2. Поређење између средњих вредности дебљине зида каротидне артерије (ИМТ) пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе

**Графикон 8.** Поређење између средњих вредности дебљине зида каротидне артерије (ИМТ) пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе ( Вредност је изражена преко средње вредности  $\pm$  стандарна девијација)



Пацијенти са реуматоидним артритисом имају статистички значајно већу вредност дебљине каротидних артерија ( $1.00 \pm 0.16$ , mm) у односу на контролну групу ( $0.89 \pm 0.13$ , mm) ( $p = 0.001$ ) (Mann Whitney U test) (Графикон 8).

**4.2.1. Демографски и лабораторијски параметри и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом**  
**Табела 4.**

	IMT $\leq$ 0.9mm n = 17	IMT $>$ 0.9 mm n = 35	p вредности
Године старости	55.05 $\pm$ 4.65	53.00 $\pm$ 6.96	p = 0.144
Пол – мушкарац/жена (%)	15.8/46	84.2/54	<b>p = 0.030</b>
ВМИ	23.74 $\pm$ 1.33	23.64 $\pm$ 1.68	p = 0.779
Систолни притисак	118.33 $\pm$ 7.9	121.16 $\pm$ 9.0	p = 0.386
Дијастолни притисак	73.89 $\pm$ 8.2	71.86 $\pm$ 8.4	p = 0.511
Укупни холестерол	4.88 $\pm$ 0.27	4.75 $\pm$ 0.46	p = 0.412
ХДЛ	1.13 $\pm$ 0.37	1.04 $\pm$ 0.25	p = 0.375
Укупни холестерол/ХДЛ	4.94 $\pm$ 2.28	4.78 $\pm$ 1.10	p = 0.748
ЛДЛ	3.68 $\pm$ 0.37	3.48 $\pm$ 0.54	p = 0.205
Триглицериди	1.24 $\pm$ 0.49	1.27 $\pm$ 0.34	p = 0.860
Гликемија	4.83 $\pm$ 0.19	4.70 $\pm$ 0.27	p = 0.170
vWF Ag,, %	150.57 $\pm$ 70.75	167.93 $\pm$ 56.87	p = 0.353
vWF Act , %	110.14 $\pm$ 51.80	145.60 $\pm$ 57.90	<b>p = 0.046</b>

Вредности су изражене преко средње вредности и стандардне девијације или процентима. НС, није статистички значајно; ESR, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин; vWF Ag, von Willebrand фактор антиген ; vWF Act, von Willebrand фактор активност;

Анализом демографских и лабораторијских параметара у табели 4. код пацијената са реуматоидним артритисом у односу преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије добијени су резултати да код мушкараца (84%) постоји статистички већа учесталост у односу на жене (54%) (p=0.030) као и да је учесталије абнормално задебљање зида каротидне артерије код пацијената који

имају повећану вредност активности фон Вилебрандовога фактора ( $p = 0.046$ ) ( $\chi^2$  test) (Табела 4).

#### 4.2.2. Функционални и лабораторијски параметри и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом

Табела 5.

	IMT $\leq$ 0.9mm n = 17	IMT $>$ 0.9 mm n = 35	p вредности
Дужина болести (године)	4.11 $\pm$ 4.20	8.14 $\pm$ 6.11	p = 0.066
ESR (mm/h)	31.44 $\pm$ 12.18	28.16 $\pm$ 12.13	p = 0.464
CRP (mg/l)	11.59 $\pm$ 9.68	10.92 $\pm$ 8.96	p = 0.841
Фибриноген (g/l)	4.05 $\pm$ 1.02	5.12 $\pm$ 0.86	<b>p = 0.005</b>
DAS 28	3.88 $\pm$ 0.47	3.64 $\pm$ 0.90	p = 0.450
HAQ	0.52 $\pm$ 0.36	0.60 $\pm$ 0.65	p = 0.741
анти ССР антитело	177.12 $\pm$ 132.13	323.32 $\pm$ 305.50	p = 0.193
RF	98.96 $\pm$ 60.98	176.73 $\pm$ 169.43	<b>p = 0.037</b>

Вредности су изражене преко средње вредности и стандардне девијације или процентима. HC, није статистички значајно; ESR, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин DAS 28, Индекс активности болести 28; HAQ, Упитник за процену здравственог стања; анти ССР антитело, антитело на циклични цитрулисани пептид; RF, реуматоидни фактор

Анализом функционалних и лабораторијских параметара у табели 5. код пацијената са реуматоидним артритисом у односу на преваленцу абнормалне дебљине зида каротидне артерије добијени су резултати да код пацијената са већим вредностима фибриногена, као и код пацијената који имају позитиван реуматоидни фактор да је учесталије абнормално задебљање зида каротидне артерије ( $p = 0.037$ ) ( $\chi^2$  test).

#### 4.2.3. Демографски и лабораторијски параметри и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије у контролној групи

Табела 6.

	IMT ≤ 0.9mm n = 10	IMT >0.9 mm n = 20	р вредности
Године старости	56.10±2.08	54.80±4.97	p = 0.323
Пол – мушкарац/жена (%)	0/43.4	100/66.6	p = 0.064
ВМИ	23.74±1.33	23.64±1.68	p = 0.779
Систолни притисак	121.00±7.38	121.50±8.75	p = 0.878
Дијастолни притисак	72.50±6.35	70.00±8.27	p = 0.409
Укупни холестерол	4.57±0.45	4.64±0.43	p = 0.657
ХДЛ	1.28±0.36	1.17±0.36	p = 0.466
Укупни холестерол/ХДЛ	3.80±0.99	4.37±1.68	p = 0.339
ЛДЛ	2.99±0.58	3.23±0.62	p = 0.302
Триглицериди	1.14±0.38	1.09±0.28	p = 0.705
Гликемија	4.79±0.25	4.60±0.34	p = 0.134
vWF Ag,, %	97.58±28.90	137.30±35.76	p = 0.055
vWF Act , %	94.05±20.74	132.34±35.73	p = 0.057

Вредности су изражене преко средње вредности и стандардне девијације или процентима. НС, није статистички значајно; ESR, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин; vWF Ag, von Willebrand фактор антиген ; vWF Act, von Willebrand фактор активност;

Анализом функционалних и лабораторијских параметара у табели 6. код контролне групе здравих испитаника у односу на преваленцу абнормалне дебљине зида каротидне артерије нису добијени статистичке значајности за дате параметре ( $\chi^2$  test).

#### 4.2.4. Утицај традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика на вредности ИМТ каротидне артерије у групи испитаника

**Табела 9.** Утицај менопаузе на дебљину каротидне артерије код пацијенткиња са реуматоидним артритисом

	Менопауза		
	Да (n=32)	Не(n=8)	
ИМТ (mm)	0.98±0.17	1.02±0.18	p=0.494

Вредности ИМТ каротидних артерија се нису статистички значајно разликовале између пацијенткиња са реуматоидним артритисом које су у менопаузи и оних које нису (Mann Whitney U test) (Табела 9).

**Табела 10.** Утицај менопаузе на дебљину каротидне артерије код жена у контролној групи

	Менопауза		
	Да (n=20)	Не(n=3 )	
ИМТ (mm)	0.86±0.13	0.91±0.16	p=0.482

Вредности ИМТ каротидних артерија се нису статистички значајно разликовале између испитаница у контролној групи које су у менопаузи и оних које нису (Mann Whitney U test)(Табела 10).



**Табела 11.** Утицај пушења на дебљину каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом

	Бивши пушач (n=13)	Непушач (n=39)	
ИМТ (mm)	1.06±0.16	0.98±0.16	P=0.141

Између пацијената са реуматоидним артритисом који су бивши пушачи и непушачи нема статистички значајне разлике у вредностима ИМТ каротидне артерије (Mann Whitney U test) (Табела 11).

**Табела 12.** Утицај пушења на дебљину каротидне артерије код контролне групе

	Бивши пушач (n=2)	Непушач (n=27)	
ИМТ (mm)	0.95±0.12	0.88±0.13	p=0.473

Између испитаника у контролној групи који су бивши пушачи и непушачи нема статистички значајне разлике у вредностима ИМТ каротидне артерије (Mann Whitney U test) (Табела 12).

#### 4.2.5. Корелација између дебљине зида каротидне артерије и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом и код контролне групе

Табела 13. Корелација између дебљине зида каротидне артерије и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом

	IMT
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Године старости	-0.244 (0.164)
BMI	-0.110 (0.437)
Систолни притисак	0.073 (0.609)
Дијастолни притисак	-0.209 (0.137)
Укупно холестерол	-0.150 (0.289)
ХДЛ	-0.085 (0.547)
Укупни холестерол/ХДЛ	-0.064 (0.652)
ЛДЛ	0.274 ( <b>0.049</b> )
Триглицериди	0.006 (0.966)
vWFAg, %	0,041 (0,773)
vWFAct, %	0,169 (0.230)

IMT, дебљина зида каротидне артерије; BMI, индекс телесне масе; ХДЛ, липопротеини високе густине; ЛДЛ, липопротеини ниске густине; vWFAg, von Willebrand фактор антиген; vWFAct, von Willebrand фактор активност;

Корелација клиничких и лабораторијских параметара у групи пацијената са реуматоидним артритисом са вредностима дебљине зида каротидне артерије показује слабу позитивну везу са вредностима ЛДЛ холестерола у серуму ( $r=0,274$ ,  $p=0,049$ ) (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 13).

**Табела 14.** Корелација између дебљине зида каротидне артерије и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом

	ИМТ
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Дужина болести (године)	0.246 (0.078)
SE	0.395 ( <b>0.021</b> )
CRP	-0.037 (0.793)
Реуматоидни фактор	0.149 (0.359)
Анти ССР антитело	0.059 (0.689)
VAS (бол)	-0.311 ( <b>0.025</b> )
Број отечених зглобова	-0.092 (0,517)
Број осетљивих зглобова	0,134 (0.345)
DAS 28	0.029 (0.836)
HAQ	0.018 (0.898)

ИМТ, дебљина зида каротидне артерије; ESR, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин; анти ССР антитело, антитело на циклични цитрулисани пептид; VAS (бол), визелна аналогна скала бола; DAS 28, Индекс активности болести 28; HAQ, Упитник за процену здравственог стања.

Корелација клиничких и лабораторијских параметара у групи пацијената са реуматоидним артритисом са вредностима дебљине зида каротидне артерије показује средње јаку корелацију са повећаним вредностима седиментације ( $r=0.395$ ,  $p=0.021$ ) и негативну корелацију са вредностима скале за субјективну процену бола (VAS) код пацијената са реуматоидним артритисом ( $r=0.311$ ,  $p=0.025$ ) (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 14).

**Табела 15.** Корелација између дебљине зида каротидне артерије и клиничких/лабораторијских параметара код контролне групе

	ИМТ
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Године старости	-0.063 (0.741)
ВМИ	0.133 (0.484)
CRP	0.009 (0.975)
ESR	-0.101 (0.595)
Фибриноген	-0.108 (0.569)
Укупно холестерол	0.109 (0.567)
ХДЛ	-0.187 (0.323)
Укупни холестерол/ХДЛ	0.205 (0.276)
ЛДЛ	0.360 (0.051)
Триглицериди	-0.046 (0.810)
vWFAg, %	0,201 (0,396)
vWFAct, %	0,341 (0.141)

ИМТ, дебљина зида каротидне артерије; ВМИ, индекс телесне масе; ХДЛ, липопротеини високе густине; ЛДЛ, липопротеини ниске густине; vWFAg, von Willebrand фактор антиген; vWFAct, von Willebrand фактор активност;

Корелација клиничких и лабораторијских параметара у контролној групи здравих испитаника са вредностима дебљине зида каротидне артерије не показује статистички значајне корелације (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 15).

**4.2.6. Повезаност између употребе лекова и средње вредности дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом****Табела 16.**

Лекови	Mean IMT $\pm$ SD	p вредности
Пацијенти који су користили кортикостероиде	1.00 $\pm$ 0.18	0.816
Пацијенти који нису користили кортикостероиде	0.99 $\pm$ 0.19	
Пацијенти који су користили MTX	1.02 $\pm$ 0.18	0.749
Пацијенти који су користили MTX/HCQ	1.00 $\pm$ 0.20	

Mean  $\pm$  SD, средња вредност  $\pm$  стандардна девијација; IMT, дебљина зида каротидне артерије; MTX, метотрексат; MTX/HCQ, комбинација метотрексата и хидроксихлорохин фосфата.

Анализом повезаности између употребе лекова и средње вредности дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом не добија се статистички значајан резултат ( $\chi^2$  test) (Табела 16).

#### 4.2.7. Одређивање параметара разлике између пацијената са реуматоидним артритисом и испитаника у контролној групи у односу на вредности ИМТ каротидне артерије

Логистичком регресионом анализом издвајани су предиктори, односно независни фактори разлике између испитаника који су имали абнормално задебљање зида каротидне артерије у односу на оне који нису.

Први је урађена униваријантна логистичка регресија којом се испитује сваки посматрани параметри између испитаника.

Параметри који су се униваријантном анализом показали као значајни улазили су у мултиваријантни регресиони модел, где је испитивана независност утицаја сваког параметра који се показао као значајан, у претходном моделу. Статистички значајан утицај параметара добијен униваријантном анализом објашњава разлику у том параметру, али у присуству свих осталих фактора. Мултиваријантном логистичком регресионом анализом издвајају се параметри који су имали независно дејство на појаву задебљања зида каротидне артерије.

Униваријантном и мултиваријантном регресионом анализом израчунава се и релативни ризик који има највише значај као „мера повезаности могућег узрока и очекиване последице“ (количник вероватноће) и она нам показује колико пута долази до промене вредности појединих параметара са појавом абнормалног задебљања зида каротидне артерије.

**Табела 7.** Бинарна логистичка регресија код пацијената са реуматоидним артритисом са селектованим клиничким и лабораторијским параметрима параметрима

	B	Станд. грешка	Wald	Степени слободе	p	Количник вероватноће	Интервал 95- постотног поверења за количник вероватноће	
							Доња граница	Горња граница
Дужина болести	0.223	0.112	3.950	1	0.047	1.250	1.003	1.557
Број отечених зглобова	-1.457	0.584	6.215	1	0.083	0.233	0.074	0.732
Фибриноген	-0.503	0.359	1.964	1	0.161	0.605	0.299	1.222
Константе	10.060	4.524	4.945	1	0.026	23381.331		

Код пацијената са реуматоидним артритисом бинарном логистичком регресијом као статистички значајно се издвојила дужина трајања болести као фактор ризика за настанак абнормалног дебљања зида каротидне артерије (Табела 7.)

Дуже трајање болести повећава за 1,2 пута ризик за повећану дебљину зида каротидне артерије Odds ratio = 1,245 (1,004 – 1,543) ( p= 0.046).

**Табела 8.** Бинарна логистичка регресија у популацији свих испитаника са селектованим традиционалним кардиоваскуларним факторима ризика

	В	Станд. грешка	Wald	Степени слободе	р	Количник вероватноће	Интервал 95-постотног поверења за количник вероватноће	
							Доња граница	Горња граница
Систолни притисак I	0,129	0,055	5,601	1	<b>0,018</b>	<b>1,138</b>	<b>1,022</b>	<b>1,267</b>
CRP	0,135	0,060	5,087	1	<b>0,024</b>	<b>1,145</b>	<b>1,018</b>	<b>1,287</b>
Укупни холестерол	2,188	0,912	5,752	1	<b>0,016</b>	<b>8,914</b>	<b>1,492</b>	<b>53,270</b>
Константа	-12,88	6,686	3,715	1	0,054	0,000		

У популацији свих испитаника са селектованим традиционалним кардиоваскуларним факторима ризика бинарном логистичком регресијом као статистички значајно су се издвојили повећан систолни притисак, ЦРП и вредност укупног холестерола као фактори ризика за настанак абнормалног дебљања зида каротидне артерије (Табела 8).

Повећан систолни притисак повећава за 1,1 пута ризик од повећане дебљине зида каротидне артерије, Odds ratio = 1,131 (1,022 – 1,267) (p = 0,018).

Повећан CRP повећава за 1,1 пута ризик од повећане дебљине зида каротидне артерије, Odds ratio = 1,145 (1,018 – 1,287) (p = 0,024).

Повећан укупни холестерол повећава за 8,9 пута ризик од повећане дебљине зида каротидне артерије, Odds ratio = 8,914 (1,492 – 53,270) (p = 0,016).

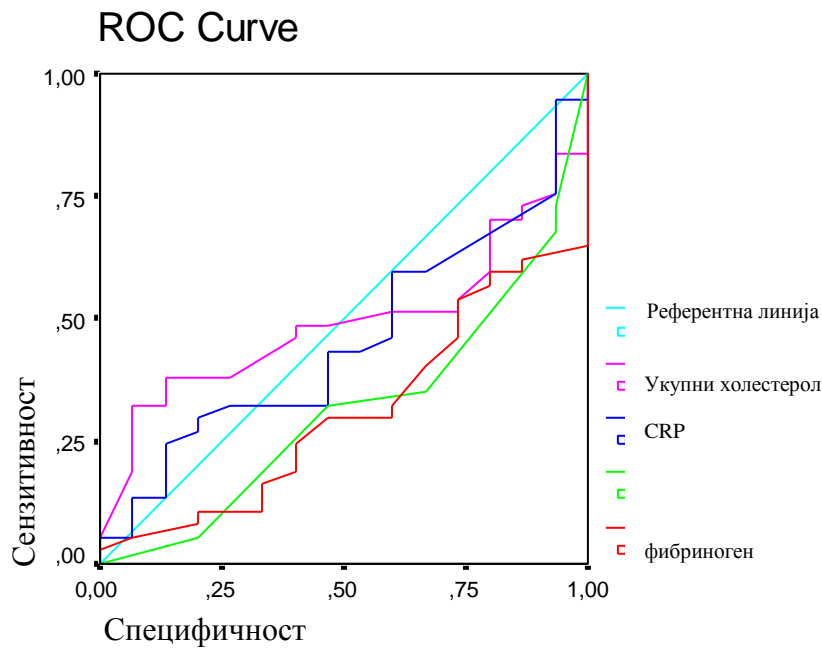


## 4.2.8. ДИНАМИКА БИОХЕМИЈСКИХ ПАРАМЕТАРА

Сензитивност и специфичност у дијагностиковању повећаних вредности ИМТ каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом

## ROC криве

Пацијенти са реуматоидним артритисом



Поље испод криве

Параметри	Поље	Станд. грешка	р	Интервал 95-постотног поверења	
				Доња граница	Горња граница
Фибриноген	0,310	0,075	<b>0,033</b>	0,163	0,457
CRP	0,457	0,084	0,628	0,293	0,620
Укупни холестерол	0,494	0,079	0,944	0,338	0,649

SE, стандардна грешка

У нашој студији посматране су биохемијске анализе параметара запаљења и липидног статуса као маркер предвиђања постојања задебљања зида каротидних артерија код пацијената са реуматоидним артритисом. Овде су приказани добијени резултати одређивања сензитивности и специфичности посматраних параметара, на основу њихових повишених вредности. Очекиван је

позитиван налаз код испитаника са повећаним вредностима интима-медија комплекса каротидних артерија код пацијената са реуматоидним артритисом.

Фибриноген може да буде маркер за повећану дебљину зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом, али веома слаб.

#### 4.2.9. Одређивање разлике између испитаника са реуматоидним артритисом који имају и који немају повећане вредности ИМТ каротидне артерије

Табела 17. Мултипла линеарна регресиона анализа дебљине зида каротидне артерије са селектованим варијаблима

Независне варијабле	Модел 1		Модел 2	
	$\beta$	р вредност	$\beta$	р вредност
Број осетљивих зглобова	0.473	0.016	0.505	0.008
VAS (бол)	-0.918	0.001	-0.938	<0.001
Укупни холестерол/ХДЛ однос	-0.391	0.033	-0.358	0.039
SE	0.280	0.154	0.347	0.048
CRP	0.170	0.254		
R <sup>2</sup>	0.416		0.333	

VAS, визуелна аналогна скала; HDL, липопротеин високе густине; SE, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин; R<sup>2</sup>, мултипли коефицијент детерминисаности,  $\beta$ , стандардни регресиони коефицијент;

Код пацијената са реуматоидним артритисом мултипла линеарна регресиона анализа је показала да повећане вредности седиментације еритроцита, броја осетљивих зглобов, VAS за бол као и индекса атеросклерозе (укупни холестерол/ХДЛ) могу објаснити у око 40% случајева појаву абнормалног задебљања зида каротидне артерије због присуства ових независних варијабли (Табела 17).

### 4.3. Мерење дилатације брахијалне артерије изазване протоком код пацијената са РА и контролном групом

Табела 18.

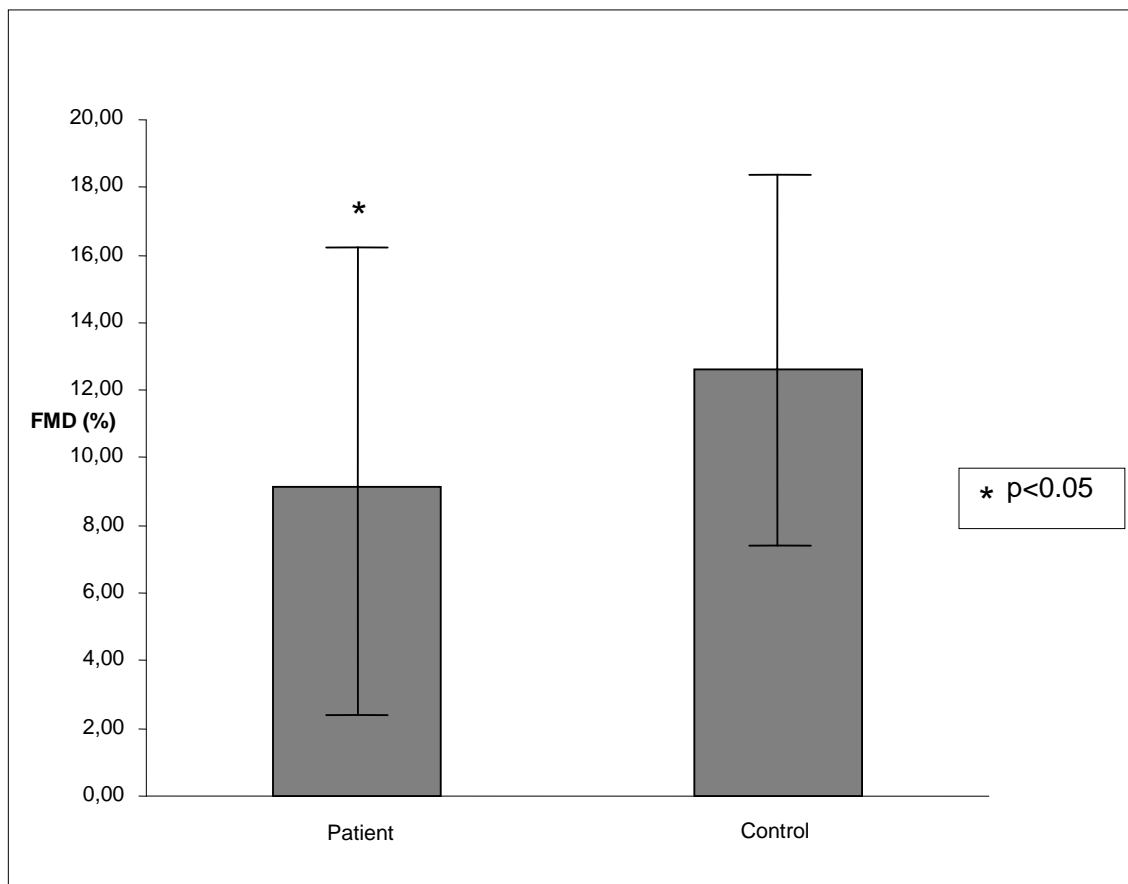
	Пацијенти (n=52)	Контрола (n=30)	Р вредност
Базални дијаметар брахијалне артерије, (mm)	4.2 ± 0.08	4.1± 0.06	p = 0.546
Дијаметар брахијалне артерије у 60 секунди,(mm)	4.7±0.07	4.9±0.08	p =0.278
Базални проток брахијалне артерије	104.53±24.71	96.94±20.12	p =0.225
Проток брахијалне артерије у 60 секунди	114.75±28.90	110.09±21.48	p =0.515
Ендотел-зависна дилатација изазвана протоком, %	9.16 ± 7.03	12.60 ± 5.49	<b>p =0.005</b>

Вредности су изражене преко средњих вредности и стандардне девијације или процентима РА, реуматоидни артритис

Поређењем средњих вредности базалног дијаметра брахијалне артерије и дијаметра у 60 секунди након хиперемичког стимуланса између пацијената са реуматоидним артритисом и испитаника контролне групе није уочена статистички значајна разлика (Mann Whitney U test) (Табела18).

Поређењем средњих вредности базалног протока брахијалне артерије и протока у 60 секунди након хиперемичког стимуланса између пацијената са реуматоидним артритисом и испитаника контролне групе није било статистички значајне разлике. Поређењем процента дилатације изазване протоком (FMD%) између пацијента са реуматоидним артритисом и контроле групе здравих људи добија се статистички значајна разлика (p = 0.005) (Mann Whitney U test) (Табела 18).

**Графикон 9.** Поређење процента дилатације изазване протоком (FMD%) између пацијента са реуматоидним артритисом и контроле групе здравих људи (средња вредност  $\pm$  SD)



SD, стандардна девијација

У поређењу са контролном групом ( $12.60 \pm 5.49\%$ ), пацијенти са реуматоидним артритисом имају статистички значајно мање вредности FMD ( $9.16 \pm 7.03 \%$ ) ( $p = 0.005$ ) (Графикон 9).

**4.3.1. Корелација између дебљине зида каротидне артерије и дијаметара, протока и ендотел-зависна дилатација изазвана протоком у брахијалној артерији код пацијената са реуматоидним артритисом и код контролне групе**

**Табела 19.** Корелација између дебљине зида каротидне артерије и дијаметара, протока и ендотел-зависна дилатација изазвана протоком у брахијалној артерији код пацијената са реуматоидним артритисом

	IMT
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Базални дијаметар брахијалне артерије, (mm)	0.037 (0.793)
Дијаметар брахијалне артерије у 60 секунди, (mm)	-0.051 (0.721)
Базални проток брахијалне артерије	0.088 (0.535)
Проток у брахијалној артерији у 60 секунди	0.060 (0.671)
Ендотел-зависна дилатација изазвана протоком, %	-0.071 (0.616)

IMT, дебљина зида каротидне артерије

Анализом корелације вредности базалног и дијаметра брахијалне артерије у 60 секунди након хиперемичког стимуланса, као и вредности базалног и протока у брахијалној артерији у 60 секунди након хиперемичког стимуланса, као и вредности ендотел-зависна дилатација изазвана протоком брахијалне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом није било статистички значајне повезаности са абнормалним вредностима дебљине зида каротидне артерије (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 19).

**Табела 20.** Корелација између дебљине зида каротидне артерије, протока и ендотел-зависна дилатација изазвана протоком у брахијалној артерији код контролне групе

	ИМТ
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Базални дијаметар брахијалне артерије, (mm)	-0.067 (0.779)
Дијаметар брахијалне артерије у 60 секунди, (mm)	-0.043 (0.856)
Базални проток брахијалне артерије	-0.077 (0.748)
Проток у брахијалној артерији у 60 секунди	0.068 (0.775)
Ендотел-зависна дилатација изазвана протоком, %	0.102 (0.670)

ИМТ, дебљина зида каротидне артерије

Анализом корелације вредности базалног и дијаметра брахијалне артерије у 60 секунди након хиперемијског стимуланса, као и вредности базалног и протока у брахијалној артерији у 60 секунди након хиперемијског стимуланса, као и вредности ендотел-зависна дилатација изазвана протоком брахијалне артерије код испитаника у контролној групи није било статистички значајне повезаности са абнормалним вредностима дебљине зида каротидне артерије (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 20).

#### 4.3.2. Утицај традиционалних кардиоваскуларних фактора ризика на вредности ендотел-зависна дилатација изазвана протоком у брахијалној артерији у групи испитаника

**Табела 21.** Утицај пола код пацијената са реуматоидним артритисом на вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD)

	Жене (n=40)	Мушкарци (n=12)	
ED-FMD %	12.47±6.83	9.43±4.21	p=0.152

Утицај пола на вредности ED-FMD није био статистички значајан код пацијента са реуматоидним артритисом (Mann Whitney U test) (Табела 21).

**Табела 22.** Утицај пола код контролне групе на на вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD)

	Жене (n=23)	Мушкарци (n=7)	
ED-FMD %	13.50±6.98	12.13±6.21	P=0.145

Утицај пола на вредности ED-FMD није био статистички значајан код испитаника у контролној групи (Mann Whitney U test) (Табела 22).

**Табела 23.** Утицај менопаузе на вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) код пацијенткиња са реуматоидним артритисом

	Менопауза		
	Да (n=32)	Не(n=8)	
ED-FMD %	12.97±7.43	10.47±3.5	p=0.361

Вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком се нису статистички значајно разликовале између пацијенткиња са реуматоидним артритисом које су у менопаузи и оних које нису (Mann Whitney U test) (Табела 23).

**Табела 24.** Утицај менопаузе на вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) код жена у контролној групи

	Менопауза		
	Да (n=20)	Не(n=3 )	
ED-FMD %	14.38±6.18	10.28±8.003	p=0.388

Вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком се нису статистички значајно разликовале између испитаница у контролној групи које су у менопаузи и оних које нису (Mann Whitney U test) (Табела 24).

**Табела 25.** Утицај пушења на вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) код пацијената са реуматоидним артритисом

	Бивши пушач (n=13)	Непушач (n=39)	
ED-FMD %	11.82±6.53	11.75±6.46	p=0.974

Вредности ED-FMD се нису статистички значајно разликовале између пацијената са реуматоидним артритисом које су бивши пушачи и оних који су непушачи (Mann Whitney U test) (Табела 25).

**Табела 26.** Утицај пушења на вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) код контролне групе

	Бивши пушач (n=2)	Непушач (n=27)	
ED-FMD %	11.97±5.96	13.61±9.41	p=0.814

Вредности ендотел-зависне дилатације изазване протоком се нису статистички значајно разликовале између испитаника у контролној групи који су бивши пушачи и оних који су непушачи (Mann Whitney U test) (Табела 26).



**4.3.3. Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе**

**Табела 27.** Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са РА

	ED-FMD %
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Године старости	0.081 (0.567)
BMI	0.137 (0.332)
Систолни притисак	0.221 (0.115)
Дијастолни притисак	0.27 (0.053)
Укупни холестерол	0.171 (0.226)
ХДЛ	-0.065 (0.645)
ЛДЛ	-0.008 (0.953)
Укупни холестерол/ХДЛ	0.151 (0,284)
Фибриноген	-0.206 (0.143)
vWfAg, %	0.201(0.396)
vWfAct, %	0.341(0.141)

BMI, индекс телесне масе; ХДЛ, липопротеини високе густине; ЛДЛ, липопротеини ниске густине; vWfAg, von Willebrand фактор антиген ; vWfAct, von Willebrand фактор активност;

Корелацијом између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом није било статистички значајне корелације (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 27).

**Табела 28.** Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са РА

	ED-FMD %
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Дужина болести (године)	0.053 (0.710)
SE	-0.041 (0.775)
CRP	-0.158 (0.264)
Реуматоидни фактор	0.092 (0.573)
Анти ССР антитело	0.006 (0.969)
VAS (бол)	0.015 (0.915)
Број отечених зглобова	-0,092 (0,517)
Број осетљивих зглобова	0,134 (0.345)
DAS 28	-0.024 (0.867)
HAQ	-0.058 (0.681)

ED-FMD, ендотел-зависна дилатација изазвана протоком; SE, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин; анти ССР антитело, антитело на циклични цитрулисани пептид; VAS (бол), визелна аналогна скала бола; DAS 28, Индекс активности болести 28; HAQ, Упитник за процену здравственог стања;

Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и клиничких/лабораторијских параметара код пацијената са реуматоидним артритисом није добијен статистички значајан резултат (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 28).

**Табела 29.** Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и клиничких/лабораторијских параметара код контролне групе

	ED-FMD %
Параметри	r коефицијент (p вредност)
Године старости	0.208 (0.379)
ВМI	0.272 (0.246)
Систолни притисак	-0.28 (0.905)
Дијастолни притисак	-0.176 (0.458)
Укупни холестерол	-0.095 (0.691)
ХДЛ	-0.181 (0.446)
ЛДЛ	-0.155 (0.513)
Укупни холестерол/ХДЛ	0.165 (0,487)
SE	0.362 (0.117)
CRP	0.363 (0.115)
Фибриноген	0,178 (0.452)
vWfAg, %	0.201(0.386)
vWfAct, %	0.341(0.151)

ВМI, индекс телесне масе; ХДЛ, липопотеини високе густине; ЛДЛ, липопотеини ниске густине; SE, ниво седиментације еритроцита; CRP, Ц реактивни протеин; vWfAg, von Willebrand фактор антиген; vWfAct, von Willebrand фактор активност;

Корелацијом између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и клиничких/лабораторијских параметара код испитаника у контролној групи није било статистички значајне корелације (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 29).

#### 4.3.4. Повезаност између употребе лекова и средње вредности ED-FMD код пацијената са реуматоидним артритисом

Табела 30.

Лекови	Mean ED-FMD $\pm$ SD	p вредност
Пацијенти који су користили кортикостероиде	13.29 $\pm$ 7.30	<b>0.023</b>
Пацијенти који нису користили кортикостероиде	9.13 $\pm$ 3.20	
Пацијенти који су користили MTX	12.14 $\pm$ 8.05	0.678
Пацијенти који су користили MTX/HCQ	11.39 $\pm$ 4.33	

ED-FMD, ендотел-зависна дилатација изазвана протоком; Mean  $\pm$  SD, средња вредност  $\pm$  стандардна девијација; ИМТ, дебљина зида каротидне артерије; MTX ,метотрексат; MTX/HCQ, комбинација метотрексата и хидроксихлорохин фосфата

Анализом повезаности између употребе лекова и средње вредности ED-FMD код пацијената са реуматоидним артритисом добијена је статистички значајна разлика код пацијента који су употребљавали мале дозе кортикостероида (13.29  $\pm$  7.30%) у односу на пацијенте које нису (9.13  $\pm$  3.20%) (p=0.023) ( $\chi^2$  test) (Табела 30).

#### 4.4. Параметри оксидационог стреса

##### 4.4.1. Разлике у параметрима оксидативног стреса између пацијената са реуматидним артритисом и контролне групе

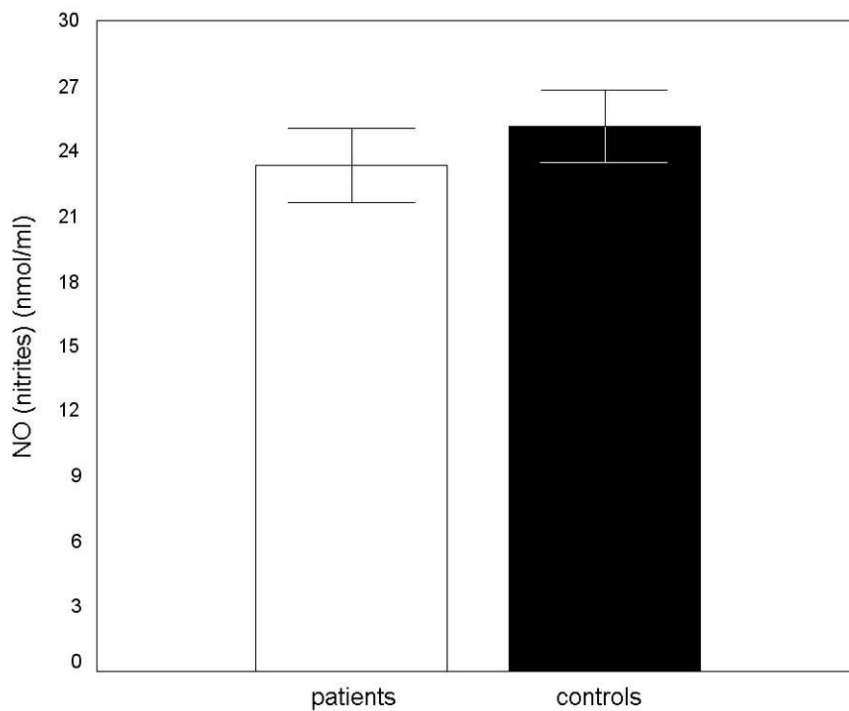
Табела 31. Разлике у параметрима оксидативног стреса између пацијената са реуматидним артритисом и контролне групе

Параметар (X±SD)	Пацијенти (n=52)	Контроле (n=20)	p
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	8.90±1.28	3.04±0.38	<b>p=0.001</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4.08±0.31	2.39±0.13	<b>p=0.000</b>
NO	23.28±1.65	25.09±1.64	p=0.669
TBARS	3.65±0.55	1.06±0.17	<b>p=0.007</b>
SOD	2918.24±477.14	643.46±200.63	<b>p=0.001</b>
CAT	39.90±3.54	38.85±2.88	p=0.817
GSH	97706.20±3293.82	93290.04±2445.27	p=0.543

Вредности су изражене преко средњих вредности и стандардне девијације (X±SD) O<sub>2</sub><sup>-</sup>, супероксид анјон; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; NO, азот моноксид; TBARS, индекс липидне пероксидације; SOD, супероксид дисмутаза; CAT, каталаза; GSH, редуковани глутатион.

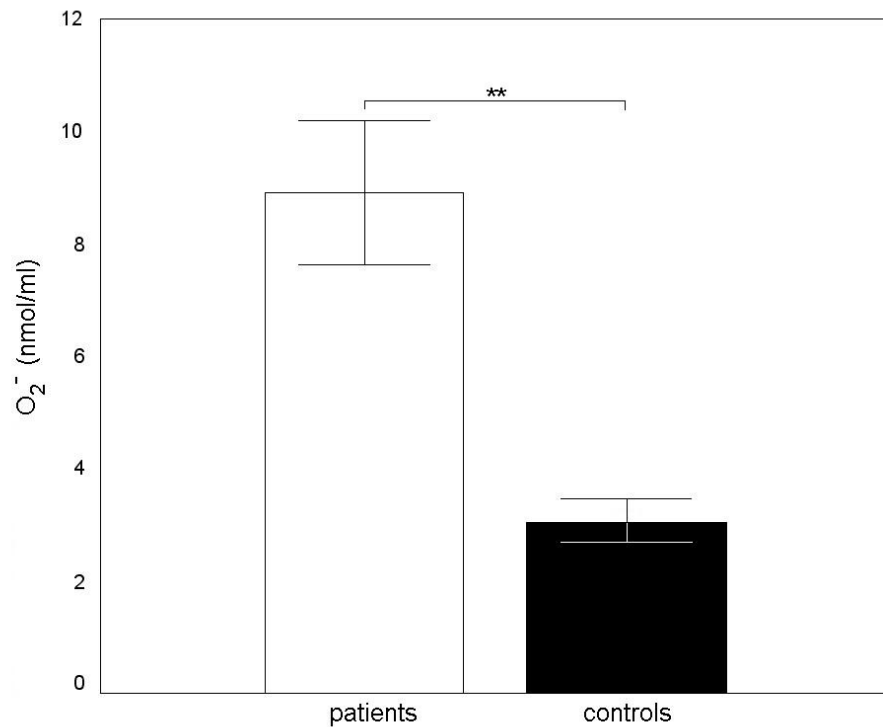
Анализом разлика у параметрима оксидативног стреса између пацијената са реуматидним артритисом и контролне групе добијене су статистичке значајне разлике у вредностима параметара супероксид анјона (p=0.001), водоник пероксида (p=0.000), индексу липидне пероксидације (p=0.007) и супероксид дисмутазе (p=0.001) (Mann Withnay U test; T test) (Табела 31).

**Графикон 10.** Вредности азот монооксида (нитрити) (nmol/ml) код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе здравих (средња вредност +SD).



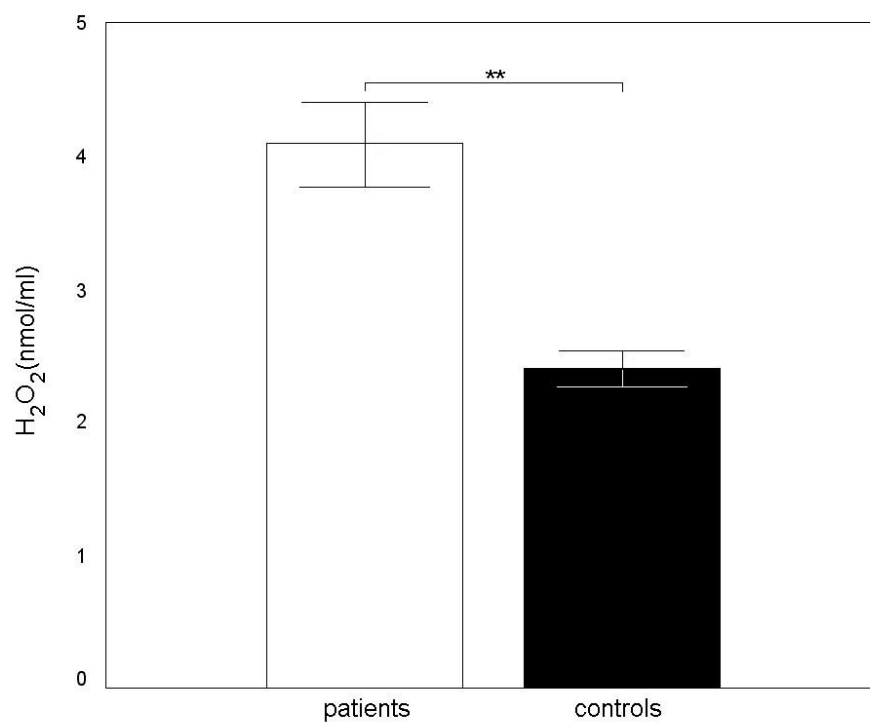
У пређењу са контролном групом ( $25.09 \pm 1.64$  nmol/ml) пацијенти са РА немају статистичку значајну разлику у вредностима  $\text{NO}_2^-$  ( $23.28 \pm 1.65$  nmol/ml) (Mann Whitney тест,  $p=0.669$ ) (Графикон 10).

**Графикон 11.** Вредности супероксид анјон радикала (nmol/ml) код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе здравих (средња вредност +SD).



У поређењу са контролном групом ( $3.04 \pm 0.38$  nmol/ml) пацијенти са реуматоидним артритисом имају статистичку значајну разлику у вредностима  $O_2^-$  ( $8.90 \pm 1.28$  nmol/ml) (Mann Whitney тест,  $p=0.001^{**}$ ) (Графикон 11).

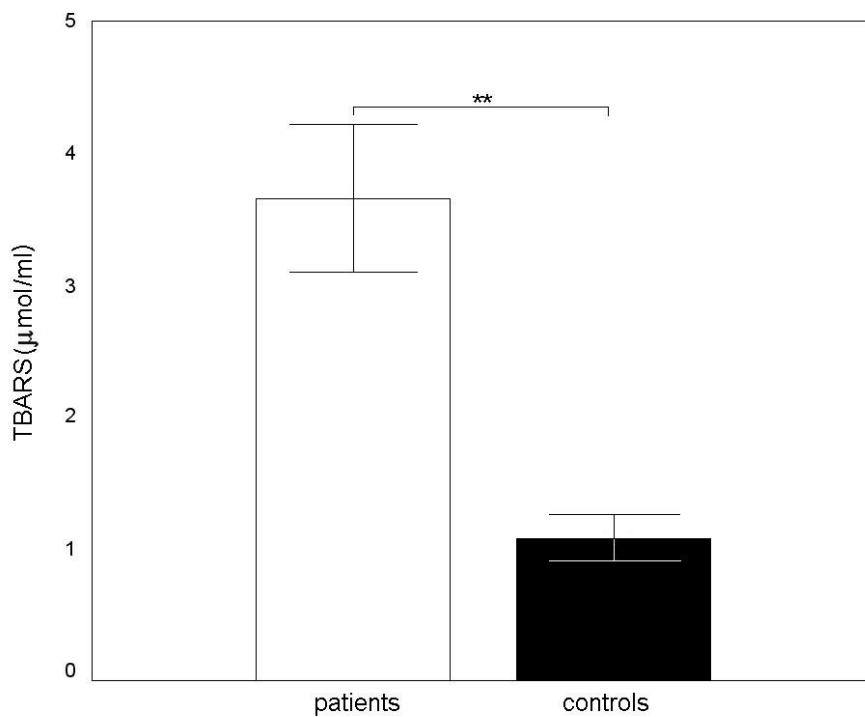
**Графикон 12.** Вредности водоник пероксида (nmol/ml) код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе здравих (средња вредност +SD).



У поређењу са контролном групом ( $2.39 \pm 0.13$  nmol/ml) пацијенти са РА имају статистичку значајну већу вредност  $H_2O_2$  ( $4.08 \pm 0.31$  nmol/ml) (Mann Whitney тест,  $p=0.000^{**}$ ) (Графикон 12).

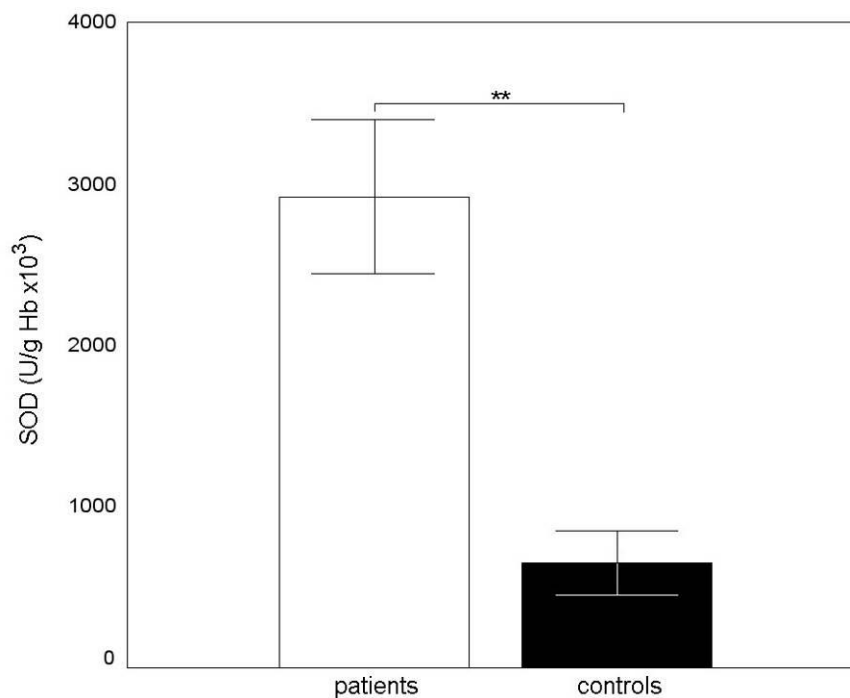


**Графикон 13.** Вредности индекса липидне пероксидације ( $\mu\text{mol/ml}$ ) код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе здравих (средња вредност  $+SD$ ).



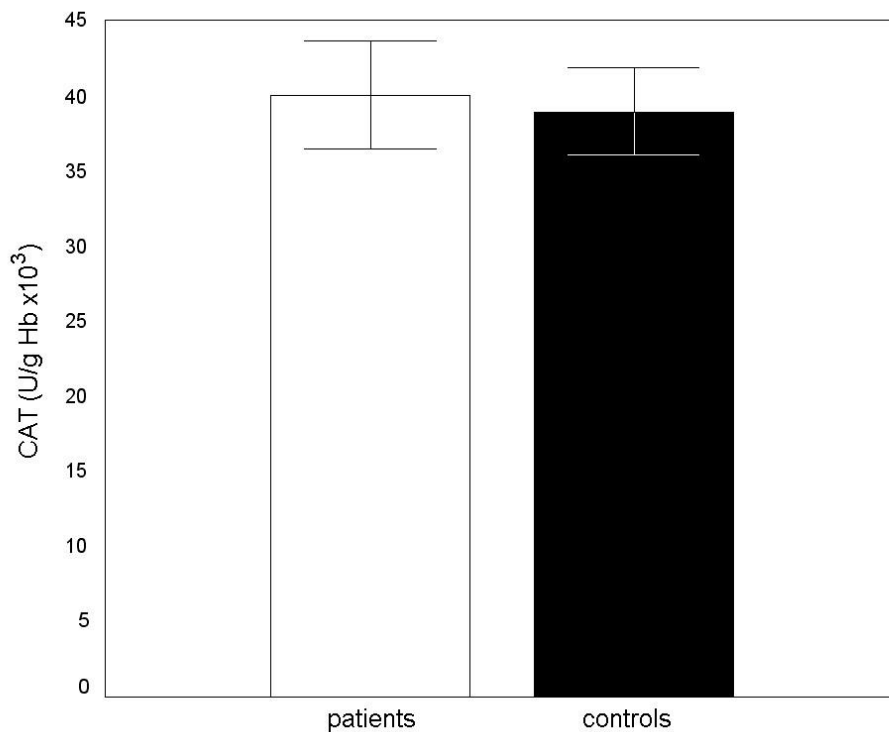
У поређењу са контролном групом ( $1.06 \pm 0.17 \mu\text{mol/ml}$ ) пацијенти са реуматоидним артритисом имају статистичку значајну већу вредност TBARS ( $3.65 \pm 0.55 \mu\text{mol/ml}$ ) (Mann Whitney тест,  $p=0.007^{**}$ ) (Графикон 13).

**Графикон 14.** Вредности активности супероксид дисмутазе ( $\text{U/g Hb} \times 10^3$ ) код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе здравих (средња вредност  $\pm$ SD).



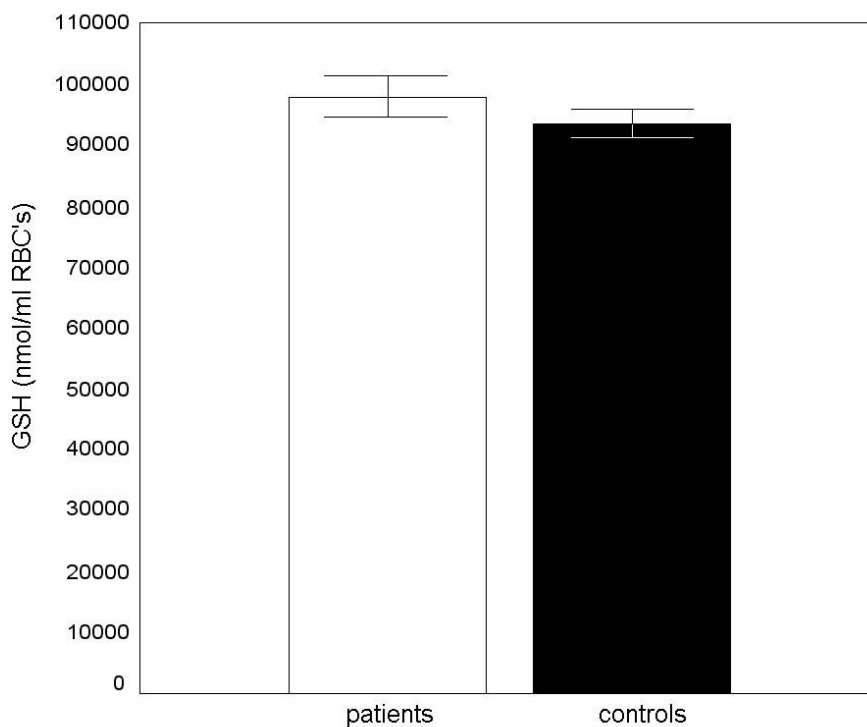
У поређењу са контролном групом ( $643.46 \pm 200.63 \text{ U/g Hb} \times 10^3$ ) пацијенти са реуматоидним артритисом имају статистичку значајну већу вредност SOD ( $2918.24 \pm 477.14 \text{ U/g Hb} \times 10^3$ ) (Mann Whitney тест,  $p=0.001^{**}$ ) (Графикон 14).

**Графикон 15.** Вредности активности каталазе ( $\text{U/g Hb} \times 10^3$ ) код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе здравих (средња вредност  $\pm$ SD).



У поређењу са контролном групом ( $38.85 \pm 2.88 \text{ U/g Hb} \times 10^3$ ) пацијенти са реуматоидним артритисом немају статистичку значајну разлику у вредности активности каталазе ( $39.90 \pm 3.54 \text{ U/g Hb} \times 10^3$ ) (Mann Whitney тест,  $p=0.817$ ) (Графикон 15).

**Графикон 16.** Вредности активности редукованог глутатиона (nmol/ml Er) код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе здравих (средња вредност +SD).



У поређењу са контролном групом ( $93290.04 \pm 2445.27$  nmol/ml Er) пацијенти са реуматоидним артритисом немају статистичку значајну разлику у вредности активности GSH ( $97706.20 \pm 3293.82$  nmol/ml Er) (Mann Whitney тест,  $p=0.543$ ) (Графикон 16).

**4.4.2. Корелација између дебљине зида каротидне артерије и параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом и контролне групе**

**Табела 32.** Корелација између дебљине зида каротидне артерије и параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом

	IMT
Параметри	r коефицијент (p вредност)
TBARS	-0.226 (0.108)
NO	0.389 ( <b>0.005</b> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0.096 (0.500)
Супероксид анјон O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-0.212 (0.131)
Каталаза	0.151 (0.286)
Супероксид дисмутаза	0.002 ( 0.991)
GSH	-0.185 (0.189)

IMT, дебљина зида каротидне артерије; TBARS, индекс липидне пероксидације; NO, азот моноксид; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; GSH, редуковани глутатион.

Анализом корелација између дебљине зида каротидне артерије и параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом добијена је статистички значајна позитивна корелација између повећаних вредности азот монооксида и вредности дебљине зида каротидне артерије ( $r=0.389$ ,  $p=0.005$ ) (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 32).

**Табела 33.** Корелација између дебљине зида каротидне артерије и параметара оксидативног стреса код контролне групе

	ИМТ
Параметри	r коефицијент (p вредност)
TBARS	0.018 (0.941)
NO	0.008 (0.973)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.496 ( <b>0.026</b> )
Супероксид анјон O <sub>2</sub> -	0.193 (0.414)
Каталаза	-0.068 (0.775)
Супероксид дисмутаза	-0.268 ( 0.252)
GSH	-0.170 (0.473)

ИМТ, дебљина зида каротидне артерије; TBARS, индекс липидне пероксидације; NO, азот моноксид; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; GSH, редуковани глутатион.

Анализом корелација између дебљине зида каротидне артерије и параметара оксидативног стреса код испитаника у контролној групи добијена је статистички значајна позитивна корелација између повећаних вредности водоник пероксида и вредности дебљине зида каротидне артерије ( $r=0.496$ ,  $p=0.026$ ) (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 33).

#### 4.4.3. Параметри оксидативног стреса и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом и код контролне групе

Табела 34. Параметри оксидативног стреса и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом

Параметар (X±SD)	IMT (mm)		p вредност
	≤0.9 (n=17)	>0.9 (n=35)	
<b>TBARS</b>	4,38±3,05	3,28±3,28	p=0,151
<b>NO</b>	19,66±10,74	24,41±9,75	p=0.981
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	4,05±1,82	3,79±1,64	p=0.552
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	7,39±7,14	10,14±6,22	<b>p=0.044</b>
<b>CAT</b>	45,11±21,61	31,68±21,80	<b>p=0.018</b>
<b>SOD</b>	3023,89±2837,26	2901,39±2915,61	p=0.675
<b>GSH</b>	98330,37±6618,77	98956,64±26776,76	p=0.390

Вредности су изражене преко средњих вредности и стандардне девијације (X±SD) IMT, дебљина зида каротидне артерије; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, супероксид анјон; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; NO, азот моноксид; TBARS, индекс липидне пероксидације; SOD, супероксид дисмутаза; CAT, каталаза; GSH, редуковани глутатион.

Поређењем средњих вредности параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом који имају абнормално задебљање зида каротидне артерије и оних који немају добијене су статистичке значајне разлике у вредностима супероксид анјона (p=0.044) и вредности каталазе (p=0.018) (Mann-Whitney U test) (Табела 34).

**Табела 35.** Параметри оксидативног стреса и преваленца абнормалне дебљине зида каротидне артерије код испитаника у контролној групи

Параметар (X±SD)	IMT (mm)		p вредност
	≤0.9 (n=10)	>0.9 (n=20)	
<b>TBARS</b>	1,10±0,74	1,05±0,85	p=0.757
<b>NO</b>	24,13±6,13	25,75±8,25	p=0.487
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	2,02±0,25	2,65±0,66	<b>p=0.028</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	2,53±1,46	3,39±1,87	p=0.314
<b>CAT</b>	38,94±10,18	38,79±14,87	p=0.758
<b>SOD</b>	855,72±1208,86	501,97±637,25	p=0.616
<b>GSH</b>	93867,16±9020,30	92905,29±12424,89	p=1.000

Вредности су изражене преко средњих вредности и стандардне девијације (X±SD)

IMT, дебљина зида каротидне артерије; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, супероксид анјон; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; NO, азот моноксид; TBARS, индекс липидне пероксидације; SOD, супероксид дисмутаза; CAT, каталаза; GSH, редуковани глутатион.

Поређењем средњих вредности параметара оксидативног стреса код испитаника у контролној групи који имају абнормално задебљање зида каротидне артерије и оних који немају добијене су статистичке значајне разлике у вредностима водоник пероксида (p=0.028) (Mann-Whitney U test; t test) (Табела 35).



#### 4.4.4. Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком и параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом и код контролне групе

**Табела 36.** Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и параметара оксидативног стреса код пацијената са РА

	ED-FMD
Параметри	r коефицијент (p вредност)
TBARS	0.063 (0.658)
NO	-0.005 (0.972)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.072 (0.612)
Супероксид анјон O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.140 (0.322)
Каталаза	-0.192 (0.172)
Супероксид дисмутаза	0.046 ( 0.744)
GSH	0.041 (0.772)

ED-FMD, ендотел-зависна дилатација изазвана протоком; TBARS, индекс липидне пероксидације; NO, азот моноксид; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; GSH, редуковани глутатион.

Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком и параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом нису добијене статистички значајне корелације (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 36).

Табела 37. Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком (ED-FMD) и параметара оксидативног стреса код контролне групе

	ED-FMD
Параметри	r коефицијент (p вредност)
TBARS	0.432 (0.057)
NO	-0.238 (0.313)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-0.384 (0.095)
Супероксид анјон O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.509 (0.122)
Каталаза	0.160 (0.510)
Супероксид дисмутаза	-0.499 (0.125)
GSH	0.348 (0.133)

ED-FMD, ендотел-зависна дилатација изазвана протоком; TBARS, индекс липидне пероксидације; NO, азот моноксид; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; GSH, редуковани глутатион.

Корелација између ендотел-зависне дилатације изазване протоком и параметара оксидативног стреса код испитаника у контролној групи нису добијене статистички значајне корелације (Pearsonova linearna korelacija) (Табела 37).

#### 4.4.5. Параметри оксидативног стреса и преваленца патолошког индекса атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом

Табела 38.

Параметар (X±SD)	Индекс атеросклерозе испод 4.5 (n=32)	Индекс атеросклерозе изнад 4.5 (n=20)	р вредност
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5.88±1.12	8.05±1.50	p=0.114
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.36±0.28	3.64±0.39	p=0.643
NO	24.41±1.56	23.29±1.93	p=0.608
TBARS	2.85±0.57	2.56±0.54	p=0.927
SOD	1822.89±433.73	2483.06±564.81	p=0.349
CAT	40.03±3.11	38.86±4.12	p=0.819
GSH	92848.68±2204.95	100502.77±4375.20	p=0.226

Вредности су изражене преко средњих вредности и стандардне девијације (X±SD); O<sub>2</sub><sup>-</sup>, супероксид анјон; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; NO, азот моноксид; TBARS, индекс липидне пероксидације; SOD, супероксид дисмутаза; CAT, каталаза; GSH, редуковани глутатион.

Поређењем средњих вредности параметара оксидативног стреса код испитаника у контролној групи који имају патолошке вредности индекса атеросклерозе и оних који немају нису добијене статистичке значајне разлике (Mann-Whitney U test; t test) (Табела 38).

#### 4.4.6. Параметри оксидативног стреса и активност болести код пацијената са реуматоидним артритисом

Табела 39.

Параметар ( $\bar{X} \pm SD$ )	DAS28			p вредност
	<3.2 (n=16)	3.2-5.1 (n=34)	>5.1 (n=2)	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	10.94±3.13	7.79±1.40	12.02±0.82	p=0.374
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4.00±0.56	4.02±0.40	5.25±0.75	p=0.304
NO	18.8±3.38	24.86±1.94	26.72±4.47	p=0.215
TBARS	3.09±0.98	3.60±0.71	7.04±1.10	p=0.440
SOD	2663.48±899.35	2861.26±574.50	4875.86±3426.94	p=0.625
CAT	34.77±4.42	41.23±4.13	49.62±45.37	p=0.592
GSH	107857.31±9974.34	93301.31±2411.58	99808.125±678.97	p=0.313

Вредности су изражене преко средњих вредности и стандардне девијације ( $\bar{X} \pm SD$ ); DAS 28, Индекс активности болести 28; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, супероксид ањон; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; NO, азот моноксид; TBARS, индекс липидне пероксидације; SOD, супероксид дисмутаза; CAT, каталаза; GSH, редуковани глутатион.

Анализом параметара оксидативног стреса између пацијената са различитом активношћу болести изражене преко DAS 28 скорa није откривена статистички значајна разлика средњих вредности параметара оксидативног стреса међу три различите групе пацијената (Kruskal-Wallis test; ANOVA) (Табела 39).

#### 4.4.7. Параметри оксидативног стреса и вредности С реактивног протеина код пацијената са реуматоидним артритисом

Табела 40.

Параметар (X±SD)	CRP		p вредност
	<5 (n=32)	>5 (n=20)	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.54±1.21	7.17±1.40	p=0.417
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.29±0.27	3.73±0.39	p=0.362
NO	25.12±1.41	22.34±2.08	p=0.371
TBARS	2.16±0.45	3.47±0.68	p=0.084
SOD	1827.95±427.43	2476.31±573.71	p=0.320
CAT	40.09±2.62	38.78±4.69	p=0.796
GSH	96382.62±3667.67	95790.86±2269.57	p=0.362

Вредности су изражене преко средњих вредности и стандардне девијације (X±SD); CRP, Ц реактивни протеин; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, супероксид анјон; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, водоник пероксид; NO, азот моноксид; TBARS, индекс липидне пероксидације; SOD, супероксид дисмутаза; CAT, каталаза; GSH, редуковани глутатион.

Поређењем средњих вредности параметара оксидативног стреса код пацијената са реуматоидним артритисом који имају повећане вредности Ц реактивног протеина и оних који немају нису добијени статистички значајни резултати (Mann Whitney U test; T test) (Табела 40).

V

# ДИСКУСИЈА

### 5.1. Повезаност параметара запаљења и атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом

Током 2010 године Европско удружење реуматолога је објавило препоруке за кардиоваскуларне болести у РА, али ту још увек има доста опречних резултата (Peters *et al*, 2010). Убрзани развој атеросклерозе у хроничним запаљенским болестима је последица утицаја традиционалних фактора ризика за кардиоваскуларне болести као што је хиперлипидемија, пушење и слично у комбинацији са запаљењем (van Sijl *et al*, 2011; Tyrrell *et al*, 2010; Frostegård, 2010). Раније се атеросклероза објашњавала пасивном акумулацијом липида у зид крвног суда. Са данашњим сазнањима, атеросклероза је препозната као динамички запаљенски процес, који почиње активацијом васкуларног ендотела, миграцијом леукоцита у зид крвног суда, оксидацијом липида, затим даље долази до дестабилизације плака и последичне тромбозе (Libby, 2008).

Реуматоидни артритис (РА) је слично као атеросклероза имуно-инфламаторна болест. Синовија у РА и атеросклеротски плак имају доста патогенетских сличности (Soltesz *et al*, 2011). У РА убрзана атеросклероза води ка последичној високој стопи морбидитета и морталитета од кардиоваскуларних болести (Kaplan *et al*, 2006). Пошто пацијенти са РА имају високу стопу морталитета због кардиоваскуларних болести, процена ендотелне функције и дебљине зида каротидне артерије (Intima media thickness – ИМТ) може бити корисно средство за индентификацију и праћење кардиоваскуларног ризика (Peters *et al*, 2010). Мета анализа 17 популационих студија испитивала је тренд кардиоваскуларног морталитета код пацијената са РА, и израчунат је индекс морталитета специфичан

за кардиоваскуларне болести (SMR) који је износио 1.61 (95% CI 1.5–1.8), што у преводу значи да је 60% код пацијената са РА повећан ризик од смрти узроковане кардиоваскуларном болешћу у односу на општу популацију (Meune *et al*, 2009). Велики напредак је направљен у разумевању механизма одговорног за повећан кардиоваскуларни ризик повезан са РА. У многим студијама је објављено да је РА нови фактор ризика за КВБ и да је повећан КВ морталитет независан од традиционалних фактора ризика (del Rincon *et al*, 2001).

Традиционални фактори ризика за кардиоваскуларне болести укључују године старости, пол, повишен крвни притисак, шећерну болест, хиперлипидемију и активно пушење (Grundy *et al*, 1999). Али када се код пацијената са РА примене важећи скор модели за израчунавање кардиоваскуларног ризика, као на пример Framingham скор, код пацијената се добија нереално мали скор (Dessein *et al*, 2005). У многим објављеним студијама фактори који утичу на повећан кардиоваскуларни ризик код пацијената са РА укључују традиционалне кардиоваскуларне факторе ризика, који делују заједно са нетрадиционалним факторима ризика, укључујући и манифестације саме болести (Del Rincon *et al*, 2001; Solomon *et al*, 2010).

РА је хронична запаљенска болест и сматра се да је запаљење кључна компонента за развој атеросклерозе (Kahn *et al*, 2010; Sattar *et al*, 2003; del Rincon *et al*, 2003). У нашој студији пацијенти са РА имају статистички значајно веће вредности SE, CRP и фибриногена у поређењу са контролном групом.

Ц реактивни протеин (C-reactive protein -CRP), је биомаркер системског запаљења и повезан је са ендотелном дисфункцијом, субклиничком атеросклерозом и артериосклерозом (Vitale *et al*, 2003) као и клиничким манифестацијама



атеросклерозе у општој популацији (Ridker *et al*, 1997). Вредност CRP и ако је у референтним вредностима може да укаже на ризик од инфаркта миокарда или цереброваскуларног инсульта у општој популацији (Ridker *et al*, 2000). Проспективне епидемиолошке студије су показале везу између нивоа високо сензитивног С-реактивног протеина (hsCRP) и ризика за будући кардиоваскуларни догађај (Ridker *et al*, 2000). У РА, цитокина као на пример интерлеукин 6 и  $\alpha$ -тумор некрозис фактор утичу на синтезу CRP у јетри (Pasceri *et al*, 2000). Истовремено, CRP индукује експресију адхезионих молекула на површини ендотела, као што је васкуларни ћелијски адхезиони молекул-1, интрацелуларни адхезиони молекул-1 и Е селектин, и повећавају адхеренцију леукоцита које има последицу оштећење ендотела (Pasceri *et al*, 2000). Поједине студије су показале да Ц реактивни протеин има предиктивну вредност за прогресију каротидне атеросклерозе код средовечних пацијената (Hashimoto *et al*, 2006). У нашој студији Ц реактивни протеин не показује статистичку корелацију са вредностима дебљине зида каротидне артерије. Ту постоји могуће објашњење. Атеросклероза зависи од кумулативног ефекта хроничног запаљења. Стога, ако се маркери запаљења мере као студија пресека не морају да корелишу са вредностима ИМТ. То је потврђено студијама у Јапану, које су показале утицај запаљења детектовано у лонгитудиналним студијама (Nagata-Sakurai *et al*, 2003). У једној проспективној студији са новооткривеним полиартритисом, CRP је био предиктор кардиоваскуларног морталитета (Goodson *et al*, 2005). Доказано је да су маркери системског запаљења показатељи већег ризика за КВ морталитет, чак и у одсуству традиционалних КВ фактора ризика (Gonzalez-

Gay *et al*, 2007). Код пацијената са РА дугог тока трајања, CRP је такође показатељ атеросклерозе, мерене преко каротидног ултразвука (Gonzalez-Gay *et al*, 2005).

У нашој студији када се ESR и CRP анализирају заједно са традиционалним факторима ризика у мултиваријантној регресионој анализи, показују се као прогностички маркери за ИМТ. У раније објављеним студијама резултати су контрадикторни. Одређен број радова не показује корелацију између CRP или SE и каротидне атеросклерозе (Kumeda *et al*, 2002; Gerli *et al*, 2005) док друге студије показују позитивну корелацију између CRP или SE и каротидне атеросклерозе (Nagata-Sakurai *et al*, 2003; del Rincon *et al*, 2003).

## **5.2.Промене у структури а.carotis communis код пацијената са реуматоидним артритисом**

Патофизиологија ендотелне дисфункције у хроничним запаљенским болестима као што је РА још увек није у потпуности разјашњена. Константна ендотелна дисфункција води ка структурном ремоделовању артерија што се може доказати повећаним вредностима дебљине зида заједничке каротидне артерије (Turiel *et al*, 2010; Sitia *et al*, 2010). Васкуларно ремоделовање почиње као један адаптивни процес на промене у „wall shear stress“ заједно са задебљањем зида крвног суда (Kiechl and Willeit, 1999) али на крају каротидни дијаметар је маркер васкуларног старења и корелира са васкуларним факторима ризика, степеном запаљења и предвиђа ризик за настанак инфаркта миокарда (Pasterkamp *et al*, 2004). Каротидна атеросклероза је добар показатељ генерализоване атеросклерозе (O'Leary *et al*, 2010; Cobble *et al*, 2010). Каротидна ултразвук даје квантитативне мере

дебљине зида каротидне артерије који се може користити за процену кардиоваскуларних болести (КВБ), ризика и за праћење сталне прогресије болести и побољшања у клиничким испитивањима. То је неинвазивна, брза, репродуктивна метода и нема ризика по пацијенте. Бројне епидемиолошке студије су утврдили да је каротидни ултразвук маркер субклиничке атеросклерозе, повезан је са класичним факторима ризика и са стопом инциденције и преваленције кардиоваскуларних болести у општој популацији. Употреба каротидног ултразвука је у предикцији исхода кардиоваскуларних болести од великог значаја и показатељ је почетка артеријског ремоделовања. Каротидна ултразвук се користи да тестира ефикасност лечења КВБ у циљу идентификације потенцијално корисних лекова и омогућава ранију регистрацију истих. У многим студијама је доказана поузданост и репродуцибилност методе ( O'Leary *et al*, 2010). Многе студије су доказале значајно повећање дебљине зида каротидних артерија код пацијената са РА (Targońska-Stepniak *et al*, 2011; Sodergren *et al*, 2010; Gonzalez-Yuanatey *et al*, 2009). Резултати неких студија (посебно у Сједињеним Америчким Државама) објавили су да нема разлике у дебљини зида каротидне артерије (Gerli *et al*, 2005) или чак супротне резултате (Roman *et al*, 2006). Каротидна атеросклероза добро корелише са класичним кардиоваскуларним факторима ризика, као и са имуносеролошким маркерима у РА (Gerli *et al*, 2008; de Groot *et al*, 2010).

У нашој студији доказана је субклиничка атеросклероза преко повећаних вредности дебљине зида каротидних артерија. Повећање дебљине зида каротидних артерија је објављена у студији која је анализирала пацијенте са РА и дугим током трајања болести а који нису имали класичне кардиоваскуларне факторе ризика

(Gonzalez-Juanatey *et al*, 2003). То се подудара и са другим публикованим студијама (Targońska-Stepniak *et al*, 2011, Södergren *et al*, 2010, Gonzalez-Juanatey *et al*, 2009, de Groot *et al*, 2010).

Подаци за ИМТ су донекле изненађујући јер нормална вредност за ИМТ у доби од 50-60 год, се очекује у нижем опсегу (0,7-0,8). Ово се може објаснити утицајем традиционалних фактора исхране у нашој студијској популацији, која се састоји од високог процента засићених масти, угљених хидрата, и ниског уноса влакана и  $\omega$ -3 масне киселине.

### **5.3. Повезаност традиционалних фактора ризика за кардиоваскуларне болести и ИМТ а.carotis communis код пацијената са реуматоидним артритисом**

Код пацијената са РА показали смо да је зид каротидних артерија дебљи код мушкараца него код жена, што се поклапа са резултатима ARIC студије која је испитивала утицај фактора ризика на вредности ИМТ у општој популацији (Dobs *et al*, 1999). Бинарна логистичка регресија показује да на вредности ИМТ преко 0,9 mm утиче мушки пол. Odds ratio за мушки пол је 6,021 (1,259 – 28,792) тј. мушкарци имају око 6 пута већи ризик за повећање дебљине зида каротидне артерије. Резултати из QUEST-RA студије такође показују повезаност између кардиоваскуларног догађаја и мушког пола код пацијената са реуматидним артритисом (Naranjo *et al*, 2008).

Студије су показале да нижи ВМІ корелира позитивно са повећаном стопом кардиоваскуларног морталитета код пацијената са РА (Escalante *et al*, 2005; Kremers *et al*, 2004). Наши резултати не показују статистички значајни утицај ВМІ на

дебљину зида каротидне артерије, мада на почетку болести ВМІ није добар показатељ новог кардиоваскуларног догађаја (Innala *et al*, 2011).

Наши резултати не показују статистички значајан утицај година старости на дебљину зида каротидне артерије. Сличне резултате је објавила и група америчких истраживача који су имали групу пацијената сличне старосне доби као пацијенти из наше студије (<60 година) (Schott *et al*, 2009). Резултати епидемиолошких студија у општој популацији указују на зависност година старости и патолошких вредности каротидног ИМТ (Kiechl *et al*, 1999; O’Leary *et al*, 1992). Наши резултати се могу објаснити тиме да је испитивана млађа група испитаника код које је још увек процес васкуларне адаптације присутан.

У нашој студији укупни холестерол и систолни крвни притисак имају предиктивну вредност за повећану дебљину зида каротидних артерија код пацијената са реуматодним артритисом. QUEST-RA студија је укључила 4,363 пацијената из 48 центара у 15 земаља је потврдила утицај традиционалних фактора ризика за развој атеросклерозе и кардиоваскуларног морбидитета у реуматоидном артритису (Naranjo *et al*, 2008). Boyer и колеге су објавили у мета-анализи 15 студија са укупно 2956 пацијената и 3713 контрола да се преваленца повишеног крвног притиска и повећаних вредности холестерола не разликује између групе пацејаната са РА и контроле (Boyer *et al*, 2011). Њихова студија показује да је нижа вредност ХДЛ холестерола више заступљена код пацијената са РА, што се подудара са резултатима у нашој студији, и може делом објаснити повећан кардиваскуларни морбидитет и морталитет у реуматоидном артритису (Boyer *et al*, 2011). Познато је да системско запаљење вводи ка структурној промени липопротеина, који после

тога имају атерогени потенцијал. Нежељени липидни профил, укључујући однос укупног холестерола са липопротеином високе густине (HDL) или такозвани атерогени липопротеински фенотип (карактерише се смањење HDL, повећањем триглицерида и повећањем липопротеина мале густине LDL), је често присутан у ПА. Статистички значајно већи ниво LDL и односа укупни холестерол/HDL пронашли смо код наших пацијента са ПА у поређењу са контролном студијом. Ниво HDL код наших пацијената са ПА је статистички значајно мањи него у контролној групи. Због умереног повећања LDL-а (иако у референтном опсегу, али на горњој граници), пацијентима је саветована контролисана дијета која има за циљ смањење LDL-а и повећање вредности HDL-а. Коришћењем линеарног регресионог модела показали смо утицај индекса укупног холестерола и HDL-а на вредности каротидног ИМТ. У многим студијама је потврђено да про-атерогени липидни профил повећава ризик за кардиоваскуларно обољевање у ПА (Jonsson *et al*, 2001; del Rincon *et al*, 2003; White *et al*, 2006). Про-атерогени липидни профил повећава кардиоваскуларни морбидитет, највероватније преко повећаних вредности LDL-а (Libby, 2008). Студије су објавиле и парадоксалне резултате као што је појава да повећан ниво LDL у серуму може бити повезан са смањеним кардиоваскуларним ризиком код пацијената са ПА (Myasoedova *et al*, 2011). У прилог томе су и резултати студије која је испитивала преваленцу класичних кардиоваскуларних фактора ризика код пацијената са ПА у односу на општу популацију. Мета анализа објављена 2001. године је показала да је пушење, шећерна болест и нижи ниво HDL холестерола више присутан код пацијената са ПА него у

општој популацији, али да је стопа преваленце повишеног крвног притиска и хиперхолестролемије слична и обе групе (Boyer *et al*, 2011)

Одређене студије су објавиле резултате који показују да је атерогени индекс смањено вредности након годину дана терапије са кортикостероидима и метотрексатом у раном РА, показујући утицај системског запаљења на промену липидног профила (Libby, 2008). У тим студијама је доказано да се липидни профил под утицајем запаљења мења према атерогеном и до 10 година пре него што је постављена дијагноза болести (van Halm *et al*, 2007). Липидни статус може послужити за праћење и процену ризика за кардиоваскуларне болести у РА. Потребно је још истражити тачну повезаност између системског запаљења и нивоа липопротеина и одредити на које партикуле посебно утиче и одређује степен ризика за КВБ. Добра супресија запаљења може имати модификујући ефекат на кардиоваскуларни ризик (Steiner and Urowitz, 2009).

#### **5.4. Повезаности биохемијских параметара коагулације и атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом**

У физиолошким условима, васкуларни ендотел производи многе супстанце које имају важну улогу у хемостази, фибринолизи и очувању васкуларног тонуса (Spiel *et al*, 2008). Једна од тих супстанци је фон Вилебрандов фактор (vWf) који се искључиво производи у ендотелу, и представља маркер ендотелне активације или дисфункције (Derhaschnig *et al*, 2009; Dessein *et al*, 2005). vWf учествује у адхезији тромбоцита на зид крвног суда, агрегацију тромбоцита и служи као носач за фактор VIII, чинећи га стабилним у циркулацији (Vischer *et al*, 2006). vWf може бити

произведен и секретован из ендотелних ћелија након одређених стимуланса *in vitro* и *in vivo*. С обзиром да сви акутни коронарни синдроми резултују формирањем тромба у преклиничкој атеросклерози, и да је кључна улога *vWF* у формирању артеријског тромба, овај биомаркер је могуће користити као предиктор кардиоваскуларних болести (Tousolis *et al*, 2007). Доказано је да *Wf* расте током акутног коронарног синдрома (Lee *et al*, 2005) и закључак је да *vWf* није само маркер, већ може учествовати у патогенези инфаркта миокарда (Spiel *et al*, 2008). Код пацијената са преклиничком васкуларном болешћу, *vWf* је значајан предиктивни параметар за будуће кардиолошке догађаје (Fuchs *et al*, 2006). У нашој студији пацијенти са РА имају значано веће вредности *vWfAct* и *vWfAg* у поређењу са контролном групом. Наши пацијенти са РА су имали висок ниво *vWf* иако је болест била у ниској активности тако да можемо претпоставити да могу бити маркер за развој КВБ у РА. Сличне резултате су објавили и други аутори упоређујући пацијенте са РА и здраве контролне групе (McEntegart *et al*, 2001; Jonsson *et al*, 2001). Други аутори су пронашли и да ниво *vWF* је статистички независно повезан са ИМТ (Daza *et al*, 2007; Södergren *et al*, 2010; Desein *et al*, 2005). У нашим резултатима нема статистичке повезаности између *vWfAct* и *vWfAg* са дебљином зида каротидне артерије код пацијената са РА и контролне групе. Неколико студија је истраживало Фон Вилебрандов фактор и његову повезаност са ендотелном дисфункцијом, атеросклерозом и/или кардиоваскуларним болестима у општој популацији (Tousolis *et al*, 2007; Spiel *et al*, 2008; Dehaschnig *et al*, 2008).

Када се истражује Фон Вилебрандов фактор као фактор ризика за кардиоваскуларне болести, лабораторијска анализа концентрације плазма активности



Фон Вилебрандовога фактора и плазма антигена Фон Вилебрандовога фактора је најчешће коришћен (Spiel *et al*, 2008). Фон Вилебрандов фактор је у студијама испитиван да би се објаснио повећан кардиоваскуларни ризик код пацијената са РА (McEntegart *et al*, 2001; Daza *et al*, 2007; de Groot *et al*, 2011). Неколико протромботичких фактора је повезивано са будућим ризиком за развој инфаркта миокарда или цереброваскуларне болести (Spiel *et al*, 2008). Значајно веће вредности Фон Вилебрандовога фактора имају наши пацијенти са РА у односу на контролну групу. Повећан ниво vWF указује на ендотелно оштећење и прокоагулантно стање као што су студије показале, у раном (Södergren *et al*, 2011) и РА са дугим током трајања (Daza *et al*, 2008). У групи пацијената са РА, пацијенти који имају веће вредности активности vWF имају и повећану дебљину зида каротидне артерије (ИМТ). Наиме, чак су други аутори пронашли да је ниво vWF независно повезана са дебљином зида каротидне артерије ИМТ (Södergren *et al*, 2011; Daza *et al*, 2008; Dessen *et al*, 2005). Ови резултати указују да је vWF потенцијално могућ маркер ендотелне дисфункције у РА који се лако детектује, а који може да предвиди будуће кардиолошке догађаје (Fuchs *et al*, 2006). Такође је показано да повећан ниво vWF може бити предиктивни маркер за рану атеросклерозу (Tousolis *et al*, 2007). Група аутора је пратила пацијенте са РА 8 година, просечне старости 63 године, и просечне дужине трајања болести 21 годину. Праћена је појава нових КВ догађаја и уочено је да је код тих пацијената била повећана серумска вредност vWF (Wallberg-Jonsson *et al*, 2000).

Због улоге vWf у хемостази и улоге оксидативног стреса у развоју ендотелне дисфункције и атеросклерозе у многим студијама је истраживана њихова повезаност

(Elahi *et al*, 2009; Dhalla *et al*, 2000; Valgimigli *et al*, 2003). Многе супстанце регулишу ослобађање vWf из ендотела. Слободни кисеонички радикали (reactive oxygen species - ROS) имају једну од важних улога у том процесу. На пример супероксид анјон радикал ( $O_2^{-}$ ) је активатор ендотелне егзоцитозе (Vischer *et al*, 1995), док водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) дозно зависну инхибира тромбином провоцирану секрецију vWf (Matsushita *et al*, 2005). Са друге стране  $H_2O_2$  може да индукује слабу секрецију vWF (Yang *et al*, 2004). Дакле ефекте  $H_2O_2$  још треба истраживати. У појединим студијама је показано да блокада азот моноксид (nitric oxide - NO) повећава секрецију vWf, тј. да азот моникид инхибира ослобађање vWf (Pernerstorfer *et al*, 2000). Ови ефекти још морају бити разјашњени, јер се већина студија бавила истраживањем на културама ендотелних ћелија што није идеално за истраживање ефеката NO (Vischer *et al*, 2006).

У нашој студији абнормално задебљање зида каротидне артерије имају пацијенти са РА и повећаним вредностима фибриногена. Група експерата је у мета-анализи која је обухватала 31 проспективну студију са 154,211 одраслих испитаника закључила да ниво фибриногена корелира са кардиоваскуларним факторима ризика (Fibrinogen Studies Collaboration, 2007).

Фон Вилебрандов фактор заједно са фибриногеном је укључен у ризик за развој кардиоваскуларних болести у многим студијама (Chaves *et al*, 2004; Chambless *et al*, 2003). Повећан ниво фибриногена и фон Вилебрандовог фактора у серуму могао би да предвиди кардиоваскуларни ризик код пацијената са РА (McEntegart *et al*, 2001). Проспективне епидемиолошке студије су показале повезаност нивоа фибриногена и кардиоваскуларног морбидитета (Danesh *et al*,

1998). У нашој студији је преко ROC кривуље доказано да фибриноген може бити маркер за претклиничку атеросклерозу изражену преко вредности ИМТ веће од 0,9 mm, али доста слаб. Сличну предиктивну вредност фибриногена за артеријски тромботични догађај је објављен у једној ранијој студији (Lowe *et al*, 1999). Неке студије су користиле безафибрате да смање ниво фибриногена и тако су последично смањили стопу нових КВ догађаја и цереброваскуларних инсульта (Behar *et al*, 1999), док су друге студије изнеле податке да се после смањивања нивоа фибриногена успорио ток кардиоваскуларних болести (MacCallum *et al*, 1999).

#### **5.5. Повезаност нетрадиционалних фактора ризика за кардиоваскуларне болести и ИМТ а.carotis communis код пацијената са реуматоидним артритисом**

Реуматоидни фактор је антитело карактеристично за РА и усмерено је на Fc фрагмент IgG. RF је детектован код 60–80% пацијента са РА и убраја се у показатеље тежине и прогресије болести. Механизми којима RF предиспонира васкуларну болест је још увек непознат. Могуће објашњење би било да имуни комплекси активирају систем комплемента и оштећују ендотел и тако га чине фактором ризика за развој кардиоваскуларних болести (Burut *et al*, 2010). Могуће је да је RF можда само једно обележје системског запаљења, које има улогу у атерогенези. Пацијенти са РА у нашој студији који су имали позитиван реуматоидни фактор имали су чешће задебљали зид каротидне артерије него пацијенти који су имали негативан реуматоидни фактор, што се поклапа са резултатима недавно објављене студије која је пронашла да је RF независан предиктор за задебљање зида каротидне артерије (Chatterjee Adhikari *et al*, 2011) Висок ниво реуматоидног

фактора је ризик за екстраартикуларне манифестације болести, што је надаље повезано са ризиком за кардиоваскуларне догађаје (Turesson *et al*, 2007). Повећана стопа смртности, посебно због кардиоваскуларних болести је доказана код пацијената са РА који су имали позитиван реуматоидни фактор у односу на друге пацијенте код којих је реуматоидни фактор био негативан (отприлике 1.5–2- пута више, разликује се у многим студијама) и код пацијенат са РА у односу на општу популацију (Gonzalez *et al*, 2008). Повезаност позитивног реуматоидног фактора, кардиоваскуларних догађаја и кардиоваскуларног морталитета у општој популацији је публикована у многим студијама (Liang *et al*, 2009; Tomasson *et al*, 2010). Постоје студије које су објавиле да је реуматоидни фактор независан фактор ризика за исхемијску болест срца, чак и у одсуству РА (Edwards *et al*, 2006). Одређен број аутора није доказало корелацију између присуства реуматоидног фактора и атеросклерозе код пацијената са РА (Jonsson *et al*, 2001; Grover *et al*, 2006).

Антитело на циклични цитрулисани пептид, који је настао посттранслационом модификацијом аргинина, представља најспецифичнији маркер за РА. Анти ЦЦП антитела су повезана са високом активношћу болести (DAS28 4.31 према 3.30,  $P = 0.001$ ), као и са високим степеном радиографских оштећења (del Val del Amo *et al*, 2006). У студијама пресека доказана је повезаност са субклиничком атеросклерозом (Gerli *et al*, 2008) и са развојем исхемијске болести срца (Lopez-Longo *et al*, 2006). Слично као и са RF, механизам ових повезаности је неразјашњен. Друге студије су доказале да је присуство антитела на циклични цитрулисани пептид и присуство реуматоидног фактора класе имуноглобулина М повезано са нарушеном ендотелном функцијом, независно од других

кардиоваскуларних фактора ризика код пацијената са РА (Solomon *et al*, 2003). Код наших пацијента са РА нема корелације између присуства антитела на циклични цитрулисани пептид и задебљања зида каротидне артерије, нити са вредностима ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије.

Маркери активности болести као што је број осетљивих зглобова и вредности визуелне аналогне скале бола (visual analog scale -VAS) код наших пацијената са РА статистички значајно корелира као фактор ризика за повећану вредност дебљине зида каротидне артерије када се израчунава заједнички утицај нивоа седиментације еритроцита, Ц реактивног протеина и односа укупног холестерола и липопротеина високе густине. Корелација коју смо доказали између броја осетљивих зглобова са вредностима ИМТ може се објаснити тако што они представљају повећану активност болести и степен запаљења. Раније студије су доказале да број осетљивих зглобова може бити независан предиктор повећаних вредности зида заједничке каротидне артерије (Grover *et al*, 2006; Chatterjee Adhikari *et al*, 2011) као и предиктор стопе кардиоваскуларног морталитета код пацијената са РА (Superko and Gadesman, 2008). Клиничке манифестације и маркери за РА који показују степен активности болести корелирају са стопом кардиоваскуларног морбидитета и морталитета. Неке студије су истраживале повезаност неколико клиничких маркера заједно (Dessein *et al*, 2007), док су неки истраживали посебно као нпр. број отечених зглобова (Jacobsson *et al*, 2001) или индекс функционалне активности пацијената (Farragher *et al*, 2007). У великој опсервационој студији која је укључила 10156 пацијената са РА маркери активности болести су придружени традиционалним факторима ризика за кардиоваскуларне болести као независни

предиктивни показатељи (Ц-статистичке вредности су повећане са 0.67 на 0.71,  $P = 0.006$ ) (Solomon *et al*, 2010)

У нашој студији пронашли смо да пацијенти са дужим током трајања РА имају већу дебљину зида каротидне артерије. Наши резултати указују да су догађаји који се јављају током трајања болести одговорни за убрзану атеросклерозу код пацијената са РА. Висок ниво системског запаљења или излагање одређеним лековима којима се лечи РА може делимично објаснити рану појаву атеросклерозе (Roja-Villarraga *et al*, 2008). Наши резултати су слични са резултатима студија који су публиковали значајну повезаност дужине болести и дебљине зида каротидних артерија (delRincon *et al*, 2007; Gonzalez-Juanatey *et al*, 2011). Del Rincon и сарадници су показали (2007) да се дебљина зида каротидне артерије пропорционално са годинама трајања болести повећава. Gonzalez и сарадници су добили резултате који показују да пацијенти који болују дуже од 14 година имају абнормално повећану дебљину зида каротидне артерије (Gonzalez-Juanatey *et al*, 2011). Постоје и студије које су објавиле резултате да дебљина зида каротидне артерије не зависи од дужине трајања болести, али су њихови пацијенти имали у просеку краће трајање болести (Södergren *et al*, 2010; Gonzalez-Juanatey *et al*, 2003; Jonsson *et al*, 2001). У неколико студија су испитивали ИМТ код пацијената са РА и краћим трајањем болести у поређењу са контролом, где нису показали већу дебљину зида каротидне артерије код пацијената са РА (Sodergren *et al*, 2011). У две скорашње студије, пацијенти са РА имају повећане вредности ИМТ у поређењу са здравом контролном групом (Hannawi *et al*, 2007; Georgiadis *et al*, 2008). Ове студије су укључиле пацијенете

старије животне доби и са већим степеном запаљења него Sodergren и сарадници што би објаснило различите резултате.

Код пацијената са дугим током трајања РА значајно расте дебљина зида каротидне артерије иако су пацијенти третирани са болест модификујућим лековима, најсавременијом анти-тумор некрозис фактор терапијом и имају ниску запаљенску активност (Gonzalez-Juanatey *et al*, 2006). Једна скорашња епидемиолошка студија показала је да је стопа кардиоваскуларног морбидитета, мерена преко инциденце инфаркта миокарда, повећана код пацијената са РА у периоду од 2 године пре постављања дијагнозе (Alizadeh Dehnavi *et al*, 2008). Аутори претпостављају да ови резултати указују на присуство запаљењем индуковане атеросклерозе много пре клиничких симптома и постављања дијагнозе РА. У мета анализи која је обухватила 68 истраживања закључено је да на вредности дебљине зида каротидне артерије утиче врста реуматске болести (РА, системски еритемски лупус или склеродермија), дужина трајања болести и већ постојећи традиционални фактори ризика за КВБ (Tyrrell *et al*, 2010)

#### **5.6. Вредности ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом**

Термин ендотелна дисфункција у ствари означава артеријску крутост са нарушеном вазодилаторном функцијом, узроковано смањењем расположивог азот монооксида које се ослобађа из ендотелних ћелија. На овом стадијуму, проинфламаторни, пролиферативни и прокоагулантни чинцоци у зиду крвног суда праве атеросклеротски плак, који касније руптурира и прави тромбозу тј клинички

манифестацију (Libby, 2008). Најважније је да је ендотелна дисфункција као рани стадијум кардиоваскуларне болести без икаквих клиничких симптома. Због тога је важно наћи методу која ће проценити васкуларну дисфункцију у раном стадијуму, посебно код пацијената са присутним високим ризиком за кардиоваскуларне болести (Correti *et al*, 2002).

Са данашњим сазнањима, неколико неинвазивних техника нуде могућност да буду маркери који могу да детектују почетак развоја атеросклерозе. Употреба ових техника може помоћи у откривању особа са високим ризиком којима можемо помоћи са превентивном терапијом да не дође до клинички манифестне болести. Ултразвучни преглед брахијалне артерије који открива постојање ендотелне дисфункције може бити користан за процену кардиоваскуларног ризика код пацијената са РА (Gonzalez-Gay *et al*, 2006). Вазодилатација брахијалне артерије изазване протоком (brachial artery flow-mediated -FMD), детектована ултразвучно у Б моду, је маркер за ендотелну дисфункцију (Correti *et al*, 2002). У општој популацији, FMD је у корелацији са другим традиционалним факторима ризика за кардиоваскуларне болести и има предиктивну вредност за будући кардиоваскуларни догађај (Bonneti *et al*, 2003). Патолошке вредности FMD су описане код пацијената са РА који немају манифестну васкуларну болест (Gonzalez-Juanatey *et al*, 2003). Пацијенти са РА у нашој студији имају статистички значајно ниже вредности ED-FMD у поређењу са контролном групом.

У групи пацијената са РА ниво седиментације значајно већи у односу на контролну групу али нема статистички значајне корелације са ED-FMD. Такође је вредност Ц реактивног протеина значајно већа у групи пацијената са РА у односу на



контролну групу али и ту нисмо доказали статистички значајну корелацију са вредностима ED-FMD. Одсуство значајне корелације у нашој студији може се објаснити чињеницом да вредности Ц реактивног протеина у серуму значајно осцилирају код пацијената са хроничним запаљенским болестима. Неке студије показују да кумулативне вредности Ц реактивног протеина корелирају са развојем атеросклерозе код пацијената са РА (Gonzalez-Gay *et al*, 2005).

У студији Holmes и сар. испитивана је повезаност CRP са вредностима ИМТ и ФМД. Није било корелације CRP и ИМТ, али су пронашли парадоксалну позитивну корелацију између CRP и ФМД. За разлику од ИМТ који је структурна промена која је повезана са субклиничком атеросклерозом и субендотелијумом зида крвног суда, FMD мери функцију ендотелних ћелија. (Holmes *et al*, 2010). Иако се генерално сматра сурогатом генерализоване функције ендотелних ћелија (Deanfield, 2007) FMD је углавном детерминисан доступношћу ендотелног азот монооксида (Joannides *et al*, 1995) који има, осим регулације тонуса крвног суда, и антиатерогену функцију (Landmesser *et al*, 2004). У присуству слободних кисеоничких радикала NO може имати штетан утицај на ендотел, али FMD мери функцију ендотелног азот монооксида у вазодилатацији (протективну) као одговор на стрес смицања зида крвног суда. Показано је да CRP има специфичан, директни ефекат на васкуларну функцију *in vitro* преко повећања стварања NO и да се у акутном азапљењу, NO-зависна вазодилатација одмах смањује али се нормализује након повећања вредности CRP (Clapp *et al*, 2005). Ови налази указују на протективну улогу CRP на продукцију NO и FMD, што би објаснило резултате неких студија које нису нашле разлике у FMD између пацијената са РА и здравих контролних група (Van Doornum

*et al*, 2003). Протективни ефекат CRP на расположивост NO може утицати на смањивање ефекта системске инфламације на атерогенезу, осим оних ефеката који су независни од NO и сугерише да делимично може бити маскиран повећањем CRP у току запаљења. Алтернативно објашњење би било да по аналогiji са NO (Fostermann *et al*, 2006), CRP може имати плејотропну улогу, некада заштитну а некада штетну.

Ми нисмо доказали значајне корелације између FMD и маркера активности болести или маркера запаљења. Скорије студије су такође објавиле резултате патолошког снижења вредности FMD у раном РА, али без значајне корелације са степеном активности болести и маркерима запаљења (García-Bermudez *et al*, 2012).

РА је комплексна болест и генетски фактори утичу на облик и тежину болести. Скорије студије су објавиле истраживања која показују генетски утицај на ризик за настанак ендотелне дисфункције и развој клинички манифестне кардиоваскуларне болести (Gonzalez-Gay *et al*, 2007; Gonzalez-Juanatey *et al*, 2003; Rodríguez-Rodríguez *et al*, 2011). Неколико алела локализованих на трећем хиперваријабилном региону *HLA-DRB1*, имају заједничке епитопе, и они су позанти као најјачи генетски фактори ризика за развој РА (потврђено је да 3 пута повећавају ризик од обољевања) (Gregersen *et al*, 1987). Алел који је носилац једног или два заједничка епитопа је повезан за тежом радиографском прогресијом болести и екстраартикуларним манифестацијама (Valenzuela *et al*, 1999). *HLA-DRB1\*0404* алел је такође повезан са ендотелном дисфункцијом (Gonzalez-Juanatey *et al*, 2003). Две британске студије су показале да наведени алели могу 1,5 до 2 пута повећати ризик за кардиоваскуларни морталитет код пацијената са РА или запаљенским

реуматизмом (Mattey *et al*, 2007; Farragher *et al*, 2008). Повезаност *HLA-DRB1* заједничког епитопа и проатерогеног липидног профила које је истраживан код пацијената са РА (Toms *et al*, 2011) може делимично објаснити механизам повезаности са раном атеросклерозом.

Статистичком анализом у нашој студији нема значајне корелације између вредности ИМТ и FMD у групи пацијената са РА. Овај резултат показује да су то два независна сурогата за мерење различитих аспеката и фаза ране атеросклерозе. Имајући у виду широк спектар регулаторних функција ендотела, није изненађујуће да не постоји ниједно мерење ендотелне функције које пружа све неопходне информације у вези васкуларног интегритета у различитим деловима васкуларног корита. Дакле, комбинација тестова који испитују различите компоненте васкуларног система је прикладније. Узимајући у обзир све параметре мерења, показује се да се ИМТ, као структурални параметар, прецизнији показатељ кардиоваскуларног ризика, док је FMD функционални показатељ на који утичу многи фактори, укључујући и оне у васкуларном зиду. Промене вредности ED-FMD се брзо дешавају и могу одражавати тренутни инфламаторни статус. На промене вредности ИМТ-а утиче много фактора и његова промена је трајнија.

### **5.7. Повезаност терапије и ране атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом**

Пацијенти са РА имају значајно већи ризик за кардиоваскуларно оболевање у односу на општу популацију сличног пола и година старости, тако да је могуће да када на време и адекватно лечимо РА као болест, можемо утицати и на развој

атеросклерозе и тако смањимо стопу морбидитет и морталитета због кардиоваскуларних болести (Libby, 2008). У нашој студији пацијенти који су узимали мале дозе кортикостероида су имали боље вредности FMD у поређењу са пацијентима који нису узимали кортикостероиде. Студије показују да је ендотелна дисфункција у РА тесно повезана са запаљењем, тако да редукција запаљења побољшава ендотелну функцију (Davis *et al*, 2007). Објављени подаци показују да се ендотелна функција значајно побољшава након употребе кортикостероида у васкулитису гигантских ћелија (иначе је основна терапија васкулитиса кортикостероиди) (Gonzalez-Juanatey *et al*, 2006). Иако кортикостероидна терапија може имати про-атерогених ефекте, као што је приказано у болесника са СЕЛ (Petri *et al*, 1994), нето ефекат на кардиоваскуларни морбидитет је позитиван. Недавна студија која је хистолошки анализирао коронарне артерије показала је више нестабилних плакова код пацијената са РА у поређењу са контролама (Aubry *et al*, 2007). Једно од могућих објашњења повољног ефекта лечења кортикостероидима би била стабилизација тих плакова. У неким студијама је доказано да стероидна терапија, изненађујуће, смањује појаву нових кардиоваскуларних догађаја и смањује стопу морталитета код пацијената са РА који у анамнези имају ранију клинички манифестну кардиоваскуларну болест (Svensson B, Hafström I, 2011). У студији BARFOT, испитиван је утицај малих доза кортикостероида код пацијената са раним РА, и није доказана статистички значајна корелација на ендотелну функцију са просечном дневном дозом преднизолонa од 7.5 mg (Svensson and Hafström, 2011). За сада нема јасних доказа о утицају различитих доза и различите дужине терапије кортикостероида на кардиоваскуларни ризик у

реуматским болестима. У нашој студији пацијенти су узимали мале дозе кортикостероида минимум 1 годину у континуитету и просечна дневна доза је била 7,5 mg. Могуће је да имуносупресивна терапија опоравља васкуларну ендотелну функцију у РА, али тај ефекат се не испољава код кратоктрајне антиинфламаторне терапије (Boyer *et al*, 2011). Теорија да се нормализацијом ендотелне функције може спречити развој убрзане атеросклерозе у хроничним запаљенским болестима је за сада врло интригантна.

У нашој студији није било статистичке значајности у утицају кортикостероидне терапије на вредности ИМТ код пацијената са РА. У досадашњим студијама су објављени контрадикторни резултати. Неколико студија показују да кортикостероидна терапија повећава дебљину зида каротидне артерије (Roman *et al*, 2006; del Rincon *et al*, 2004), док је у другима доказан супротан ефекат терапије (Wallberg-Jonsson *et al*, 2004). Поред тога, резултати зависе од типа и комбинације употребљаваних лекова, њихове ефикасности и нежељених ефеката као и дужине терапије и комбинације са другим лековима.

Терапија у РА је важан фактор ризика за настанак ендотелне дисфункције и атеросклерозе. Наши пацијенти су употребљавали нестероидне антиинфламаторне лекове као и болест модификујуће лекове – метотрексат, хидрокси хлорохин фосфат и мале дозе кортикостероида. У нашој студији није било статистички значајне корелације између терапије РА и дебљине зида каротидне артерије. У студијама које су испитивале утицај употребе антималярике у терапији РА нису показале утицај на кардиоваскуларно обољевање пацијената. Мада, са данашњим сазнањима, антималярици се користе у терапији антифосфолипидног синдрома јер

имају антиромботични ефекат тако да би било потребно и даље истраживати у правцу бенефита терапије антималярике на превенцију КВ морбидитета у РА.

Метотрексат је најпреписиванији лек за РА од 1980. године, и он је камен темељац за све комбинације са БМЛ и третмане са биолошком терапијом. Терапијски водич који препоручује Америчко и Европско удружење реуматолога препоручује метотрексат као терапију прве линије (Smolen *et al*, 2010). Метотрексат је структурни аналог фолне киселине. Иако механизам деловања малим дозама метотрексата није комплетно разјашњен, највероватније се аденозин ослобађа из ћелија а окидач су полиглутамати, метаболити лека. Овим ефектом се утиче на смањивање запаљења (Chan *et al*, 2010). Мултинационална студија пресека је објавила резултате да дужа употреба метотрексата повезана са мањом преваленцом инфаркта миокарда и мозданог инсулта, мада је овај тренд потврђен и за друге лекове за РА (Naranjo *et al*, 2008). Слично је у Канади, велика студија је објавила резултате да је употреба метотрексата повезана са смањеном преваленцом инфаркта миокарда (релативни ризик [RR] = 0.81, 95% CI 0.60–1.08), тајкође је испитиван и утицај других хемијских болест модификујућих лекова (Suisa *et al*, 2006). Епидемиолошка студија са 16,752 пацијената са РА показала је да метотрексат смањује појаву нових кардиоваскуларних догађаја (модификован HR = 0.65, 95% CI 0.59–0.72) (Hochberg *et al*, 2008). Супротни резултати су добијени у студији у САД где је употреба метотрексата упоређивана са употребом других хемијских БМЛ и није уочена редукција у кардиоваскуларном обољевању (Greenberg *et al*, 2011). Студије које су испитивале утицај метотрексата на дебљину зида каротидне артерије су дале опречне резултате. Kumeda и сарадници нису

пронашли статистички значајну разлику у вредностима ИМТ између пацијената са РА који су употребљавали метотрексат и оних који нису (Kumeda *et al*, 2002). У другој студији третман са МТХ који је трајао минимум 6 месеци довео је до значајно смањења дебљине зида каротидне артерије (Wallberg-Jonsson *et al*, 2004). Различити механизми могу да објасне кардиопротективни ефекат метотрексата код пацијената са РА. Да ли лек делује директно на атеросклеротску лезију или свој кардиопротективни ефекат испољава преко супресије запаљења остаје непознато. Докази из цитолошких студија указују да метотрексат може олакшати излазак холестерола из ћелија зида крвног суда, преко аденозин ослобађајућег пута (Reiss *et al*, 2008).

Испитивање утицаја терапије за РА на кардиоваскуларни ризик мора узети у обзир и друге факторе ризика код пацијената оболелих од РА (Boyer *et al*, 2011; Gonzalez-Juanatey *et al*, 2006).

### **5.8. Поређење параметара оксидационог стреса и вредности ИМТ а.сarotis communis и ендотел-зависне вазодилатације брахијалне артерије код пацијената са реуматоидним артритисом**

Оксидативни стрес се јавља када дође до неравнотеже између продукције реактивних кисеоничних врста (reactive oxygen species - ROS) и активности антиоксиданаса (Montuschi *et al*, 2007). Због тога долази до оштећења ткива дејством ROS што може имати важну улогу у патогенези запаљенских и дегенеративних болести, укључујући атеросклерозу и РА (Stocker *et al*, 2004 Hitchon *et al*, 2004). Да ли је оксидативни стрес узрок атеросклерозе или се јавља као

последица већ насталог васкуларног оштећења је још увек предмет расправе (Hamilton *et al*, 2004)

С обзиром да је патофизиологија РА још увек непотпуно разјашњена, реактивни кисеонични и азотни радикали (reactive oxygen and nitrogen species - RONS) могу имати улогу у његовој патогенези (Cimen *et al*, 2000). Повећано стварање ROS нарушава аниоксидативни статус и може да мења експресију инфламаторних цитокина појачавајући запаљење и узрокујући ткивна оштећења у аутоимуним болестима, и показујући повезаност са степеном активности болести (Shah *et al*, 2011). Осим тога, запаљење и релативна хипоксија у зглобовима додатно појачавају оксидативни стрес (Hitchon *et al*, 2004). Синовијална течност у запаљеном реуматоидном зглобу обилује активираним неутрофилима који преко Fenton реакције продукују велике количине супероксид радикала (superoxide radical  $-O_2^-$ ), водоник пероксида ( $H_2O_2$ ) и високо реактивног хидроксил радикала (OH $^{\cdot}$ ) (Grabowski *et al*, 1997).

Објављено је више студија које су испитивале директну улогу оксидативног стреса у РА (Ozkan *et al*, 2007, Altindag *et al*, 2007, Baskol *et al*, 2006). Такође је доказано да антиоксиданти борбом против оксидативног стреса могу успорити развој реуматских болести (Costenbader *et al*, 2010). Иако је доказан инверзни однос између ситемског запаљења и антиоксидативног статуса у серуму, релативно се мало зна о утицају антиоксиданаса на почетак ових болести код људи (Profumo *et al*, 2008, Costenbader *et al*, 2010). Поред улоге у хроничним аутоимуним запаљенским обољењима, оксидативни стрес може допринети патогенези атеросклерозе кардиоваскуларних болести. Оксидативни стрес је предложен као један од могућих



механизама убрзане атеросклерозе у РА (Hitchon *et al*, 2004), али та хипотеза још увек није сигурно доказана.. Постоји неколико механизама којима оксидативни стрес може убрзати атеросклерозу (Stocker *et al*, 2004): кључни је модификација LDL и HDL холестерола оксидацијом, што је посебно интересантно у РА, где је доказано да повећана концентрација оксидованог LDL и HDL, који имају проинфламаторни и проатерогени ефекат (McMahon *et al*, 2006; Nagy *et al*, 2010) што је у директној вези са развојем атеросклерозе (McMahon *et al*, 2009; Steinberg *et al*, 2009).

Оксидативни стрес у нашој студији је повећан код пацијената са РА у односу на здраву контролну групу. Слични резултати су објављени и у другим студијама које су испитивале утицај оксидативног стреса код пацијената са РА (Rho *et al*, 2010; Ozkan *et al*, 2007; Altindag *et al*, 2007). Параметри оксидативног стреса у нашој студији мерених код пацијената са РА нису показали корелацију са параметрима запаљења што се подудара са резултатима других студија (Altindag *et al*, 2007). Једно од могућих објашњења наших резултата је где нема повезаности оксидативног стреса и системских маркера запаљења је вероватно што се повећан оксидативни стрес највише дешава локално у зглобовима, где неутрофили и макрофаги играју велику улогу, као и лимфоцити.

Од када је доказано да анти ТНФ терапија смањује оксидативни стрес (Kageyama *et al*, 2008) претпоставља се да је висока активност запаљења повезана са оксидативним стресом у РА и да се са адекватном терапијом може побољшати. Наши пацијенти нису лечени биолошком терапијом већ хемијским БМЛ и нисмо пронашли повезаност параметар оксидативног стреса и терапије за РА. У ранијим

студијама су истраживачи код пацијената са РА пронашли корелацију са параметријма оксидативног стреса и активности болести (Hassan *et al*, 2011; Jikimoto *et al*, 2002). Друге студије нису пронашле значајну корелацију између параметара оксидативног стреса и активности РА (Altindag *et al*, 2007), што се подудара са резултатима у нашој студији.

Оксидативни стрес има кључну улогу у патогенези атероклерозе и има индиција да он може да објасни убрзани развој атеросклерозе у запаљенским реуматским болестима као што је РА и системски еритемски лупус (Hahn *et al*, 2007). Повећано ставарање слободних кисеоничких радикала у крвним судовима стимулисано је притиском, растезањем, стресом смицања, хипоксијом и секреторним факторима (Griendling *et al*, 1994). Многи традиционални кардиоваскуларни фактори ризика повезани су са повећаним оксидативним стресом, укључујући повишен крвни притисак, хиперлипидемију, пушење и гојазност (Montuschi *et al*, 2007). Повећан оксидативни стрес је повезан са калцификацијама коронарних крвних судова у здравој популацији средњих година (Gross *et al*, 2005). Од када је утврђено да РА је повезан са већом стопом кардиоваскуларног морталитета (Pincus *et al*, 2006) и убрзаном коронарном атеросклерозом (Roman *et al*, 2006), важно је објаснити повезаност оксидативног стреса и убрзане атеросклерозе. Почетак атеросклерозе се повезује са повећаном производњом слободних кисеоничких радикала у митохондријама ендотелних ћелија из дисфункционалног респираторног ланца (Bonomini *et al*, 2008). У РА су два механизма повећаног оксидативног стрес: преко активираних полиморфонуклеара и оштећења изазвана исхемијом и реперфузијом у запаљеним зглобовима. Слободни

радикали који нису уклоњени изазивају липидну пероксидацију. Липидна пероксидација је важна у патогенези тумора, атеросклерозе, дегенеративних болести и артритиса. Током липидне пероксидације полинезасићене масне киселине подлежу оксидацији и стварају липидне пероксил радикале који поново изазивају оксидацију полинезасићених масних киселина и тако у ланчаној реакцији оштећују мембрану ћелије. Пацијенти са РА у нашој студији имају значајно већи ниво индекса липидне пероксидације (thiobarbituric acid reactive substances –TBARS) у односу на здраву контролну групу. То се подудара са резултатима претходних студија (Taysi *et al*, 2002; Vipartene *et al*, 2006; Hassan *et al*, 2011; Shah *et al*, 2011). Висок ниво продуката липидне пероксидације је објављен у студијама код пацијената са РА у синовијалној течности и серуму. У нашој групи пацијената са РА маркери липидне пероксидације су били такође повећани у серуму у односу на здраву контролну групу. Није било корелације са вредностима ИМТ и ФМД (Gambhir *et al*, 1997). Значајно повећање индекса липидне пероксидације и позитивна корелација са високом активношћу болести је нађена у РА (Shah *et al*, 2011). Резултати студија указују да комбинација хроничног запаљења и повећаног индекса липидне пероксидације у РА може објаснити повећан КВ ризик код тих пацијената (Paredes *et al*, 2002).

Ми смо у нашој студији добили значајно веће вредности супероксид анјон радикала и водоник пероксида код пацијената са РА у односу на контролну групу. Супероксид анјон радикал у плазми може да се конвертује у водник пероксид помоћу супероксид дисмутазе, али водоник пероксид се највероватније није конвертовао под утицајем каталазе или глутатиона. Могуће је да се водоник

пероксид конвертује у хидроксил радикал помоћу гвожђа помоћу ниског нивоа трансферина и може повећати серумску липидну пероксидацију код пацијената са РА.

Азот моноксид (Nitric oxide -NO) је молекул са кратким полуживотом који има важну улогу у физиолошким функцијама, укључујући регулацију тонуса крвних судова, запаљења, функција митохондрија и апоптозе (Vanhoutte, 2000). С обзиром да је NO врло нестабилан, у лабораторији се користи мерење његових стабилних метаболита, нитрата и нитрита (nitrite - NOx), као мера за индекс стварања NO и маркер за активност ензима азот-моноксид синтетазе (nitric oxide syntetase - NOS) (Choi *et al*, 2003). Смањење стварања NO, може играти значајну улогу у нарушеној ендотел зависној дилатацији. У прилог томе говоре резултати студије која је доказала да генски полиморфизам индуцибилне и ендотелне азот моноксид синтетазе (NOS2A и NOS3) може повећати стопу кардиоваскуларних догађаја код пацијената са РА (Gonzalez-Gay *et al*, 2009). Резултати наше студије показују да нема разлике између вредности азот монооксида у серуму код пацијената са РА и контролне групе здравих. Ниво NO код наших пацијената са РА позитивно корелира са вредностима ИМТ. Серумски азот моноксид се више продукује током запаљења и може учествовати у развоју атеросклерозе. Одређен број студија је објавило резултате којима показују повећање ендogene синтезе NO у РА, што се може објаснити дисфункцијом Т лимфоцита (Karppi *et al*, 2010; Vipartene *et al*, 2006; Choi *et al*, 2003). У прилог томе говоре резултати студије која је објавила смањивање нивоа нитрата, нитрита и нитратата+нитрита након терапије анти ТНФ алфа лековима у РА (Gonzalez-Gay *et al*, 2010). Постоје студије и са контрадикторним

резултатима (Profumo *et al*, 2012), што се објашњава тиме да потрошња NO у серуму настаје због реакције са активним супстанцама као што је супероксид и долази до стварања перокси нитрата и нитрозованих протеина. Наши резултати потврђују раније студије да NO може бити биомаркер кардиоваскуларног ризика (Karlson *et al*, 2008; Profumo *et al*, 2012) и који су у складу са налазима да нарушен метаболизам NO води ка ендотелној дисфункцији која је део патогенезе атеросклерозе (Vuilleumier *et al*, 2010).

Ћелије имају различите аниоксидативне системе за одбрану од слободних радикала. Цируклишући хумани еритроцити способни су да хватају  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  који су екстрацелуларно а створени од активираних неутрофила, механизмима помоћу супероксид дисмутазе (superoxide dismutase -SOD) и каталазе (catalase - CAT).  $O_2^-$  се конвертује у  $H_2O_2$  некада спонтано или чешће реакцијом катализованом SOD, ензимом који има две изоформе, једну коју индукују инфламаторни цитокини као што је тумор некрозис фактор-алфа (tumor necrosis factor- $\alpha$  - TNF- $\alpha$ ). Релација између еритроцитне SOD и PA још није јасна. Досадашњи резултати студија о антиоксидативном статусу код пацијена са PA су контрадикторна, неке студије су објавиле пад у антиоксидативном систему (Hassan *et al*, 2011; Shah *et al*, 2011; Vipartene *et al*, 2006), док су друге пронашле неизмењен антиоксидативни систем (Cimen *et al*, 2000), што је у корелацији са резултатима у нашој студији. Наши пацијенти са PA су имали повећане вредности SOD у односу на контролну групу, а вредности CAT и глутатиона (GSH) се нису статистички значајно разликовале у односу на контролну групу. Наши резултати за CAT су слични као у другим студијама (Vasanthi *et al*, 2004; Jaswal *et al*, 2003) али неке студије су објавиле и

смањење активности (Kamanli *et al*, 2004). Ниво серумског GSH је непромењена у многим студијама што се подудара са нашим резултатима (Cimen *et al*, 2000). Наши резултати показују да је у РА примарно прекомерно стварање слободних радикала тј. повећање оксидативног стреса а не нарушавање његовог одбрамбеног система.

Бројне базичне и клиничке студије су индетификовале да реактивни кисеонички радикали (ROS, нпр.  $O_2^-$  и  $H_2O_2$ ) имају велику улогу у оштећењу ендотела и развоју атеросклерозе (Higashi *et al*, 2009; Vanhoutte *et al*, 2009; Satoh *et al*, 2011). Наши резултати показују да пацијенти са РА који имају абнормално дебљање зида каротидне артерије имају повећане серумске вредности супероксид анјона а снижене вредности каталазе. У контролној групи испитаници са већом преваленцом абнормално дебљање зида каротидне артерије имају повишене вредности водоник пероксида. Мада, прецизан механизам како ROS нарушавају васкуларну функцију није још у потпуности разјашњен,  $H_2O_2$  има кључну улогу као сигнални молекул у физиолошким условима (Vanhoutte *et al*, 2001). Студије су откриле да је  $H_2O_2$  један од ендотел хиперполаризованих фактора (endothelium-derived hyperpolarizing factor-EDHF) који је сигнални молекул у васкуларном систему у врло малим концентрацијама (Matoba *et al*, 2000). ROS мења функцију вакуларних глатких мишићних ћелија и утиче на њихов раст (Taniyama *et al*, 2003). ROS повећава ћелијску пролиферацију, хипертрофију зависно од концентрације (Griendling *et al*, 1998). Такође интрацелуларна продукција ROS учествује у патогенези кардиоваскуларних болести (Alexander *et al*, 1995) али се специфични циљни молекули још истражују. Супероксид анјон радикал слаби ендотел зависну вазодилатацију и утиче на контракцију глатких миошићних ћелија зида крвог суда

преко формирања хидроксил радикала (Vanhoutte *et al*, 2000). Супероксид анјон радикал се мења у водоник пероксид који има директан ефекат на релаксацију глатких мишићних ћелија крвног суда преко ефекта хиперполаризације. Механизам хиперполаризацијен индуковане  $H_2O_2$  је комплексан и зависи од типа крвног суда. Ендотелне ћелије крвних судова стварају мале количине супероксид анјона и  $H_2O_2$  (Takaki *et al*, 2008).  $H_2O_2$  се катализује у  $H_2O$  и  $O_2$  или се конвертује у хидроксил радикал који изазива ендотел-зависне контракције преко активације вазоконстрикторних простагноида у глатким мишићним ћелијама. ROS учествује у патогенези задебљања интима крвних судова преко стимулације раста глатких мишићних ћелија (Baas *et al*, 1995) као и стимулацијом запаљења (Libby, 2002).

## VI

# ЗАКЉУЧЦИ



На основу наведеног истраживања може се закључити следеће:

1. Код испитаника са реуматоидним артритисом васкуларно ремоделовање је процес који наступа брже него ког контролне групе здравих испитаника и манифестује се у виду значајног повећања дебљине интима-медија комплекса *a.carotis communis*.
2. Испитивањем повезаности традиционалних фактора ризика и дебљине зида каротидне артерије показано је да је најзначајнији предиктор повећаног интима-медија комплекса *a.carotis communis* код испитаника са реуматоидним артритисом систолни крвни притисак, укупни холестерол, ЛДЛ холестерол, мушки пол и Ц реактивни протеин.
3. Испитивањем повезаности нетрадиционалних фактора ризика и дебљине зида каротидне артерије показала су да је најзначајнији предиктор повећаног интима-медија комплекса *a.carotis communis* код пацијената са реуматоидним артритисом дужина трајања болести, седиментација, фибриноген, позитиван реуматоидни фактор и активност фон Вилебрандовог фактора.
4. Реуматоидни артритис смањује вазомоторни утицај ендотела *a.brachialis*. Функционална способност ендотела периферних артерија за ендотел-зависном релаксацијом (ефекат реактивне хиперемije) значајно опада код пацијената са реуматоидним артритисом у односу на контролну групу здравих испитаника.
5. Наши резултати показују да од свих примењених облика терапије, мале дозе гликокортикоида у терапији реуматоидног артритиса доводе до статистички значајног побољшања вредности ендотел-зависне вазодилатације *a.brachialis* код пацијената са реуматоидним артритисом.

6. Код испитаника са реуматоидним артритисом процес васкуларног ремоделовања (повећања дебљине интима-медија комплекса а.сarotis communis) није упоредан са смањењем способности ендотела за ендотел-зависном релаксацијом а.brachialis.

7. Испитивани параметри оксидационог стреса код испитаника са реуматоидним артритисом показују различиту динамику у односу на групу испитаника ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  и TBARS су значајно веће вредности док вредности NO не показују значајне промене), што би могло да значи да је код пацијената са реуматоидним артритисом повећан оксидативни стрес у односу на контролну групу.

8. Динамика антиоксидационе заштите је била следећа: вредности SOD су биле статистички веће у групи испитаника са реуматоидним артритисом, док су вредности CAT и GSH не показују значајне промене у односу на контролну групу. Наши резултати показују да у реуматоидном артритису није нарушена антиоксидациона заштита.

9. Код испитаника са реуматоидним артритисом је уочена статистички значајана разлика у вредностима vWfAct у односу на контролну групу здравих испитаника. Овај резултати сугерише да је код пацијената са реуматоидним артритисом присутна ендотелна дисфункција и vWfAct може бити од великог дијагностичког значаја.

10. Неинвазивне методе као што је ултразвучни преглед каротидне артерије и процене ендотелне функције брахијалне артерије могу бити поуздана и безболна метода у дијагностичкој процени кардиоваскуларног ризика код пацијената са реуматоидним артритисом.

## VII

# ЛИТЕРАТУРА

**7.1. ЛИТЕРАТУРА**

- 1) Abbot SE, Whish WJ, Jennison C, Blake DR, Stevens CR (1999). Tumour necrosis factor alpha stimulated rheumatoid synovial microvascular endothelial cells exhibit increased shear rate dependent leucocyte adhesion in vitro. *Ann Rheum Dis* 58(9):573-81.
- 2) Acharya J, Panchard NA, Taylor JA, Thompson RP, Pearson TC (1991). Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol* 47(4):287-91.
- 3) Aird WC (2007). Phenotypic Heterogeneity of the endothelium. *Circ Res* 100:158-73
- 4) Alderton WK, Cooper CE, and Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593–615.
- 5) Alexander RW (1995). Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25(2):155-61.
- 6) Alizadeh Dehnavi R, Beishuizen ED, van de Ree MA, Le Cessie S, Huisman MV, Kluft C, Princen HM, Tamsma JT (2008). The impact of metabolic syndrome and CRP on vascular phenotype in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Intern Med* 19:115-121
- 7) Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N (2007). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 40(3-4):167–71.
- 8) American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines (2002). Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis 2002 Update. *Arthritis and Rheumatism* 46: 328-346.
- 9) Anderson EA, Mark AL (1989). Flow-mediated and reflex changes in large peripheral artery tone in humans. *Circulation* 79:93-100.

- 10) Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA, editor. Handbook of methods for oxygen radical research. Ine: Boca Raton, CRC Press; p. 123-132.
- 11) Antunes F, Salvador A, Marinxo HS, Alves R, Pinto RE (1996). Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes. An integrative kinetic model. *Free Radic Biol Med* 21(7):917-43.
- 12) Arnet UA, McMillan A, Dinerman JL, Ballermann B, Lowenstein CJ (1996). Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. *J Biol Chem* 271:15069-73.
- 13) Aviña-Zubieta JA, Choi H, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D (2008). Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: A meta- analysis of observational studies. *Arthritis Rheum* 59: 1690-1697
- 14) Avolio A(1995). Genetic and Environmental Factors in the Function and Structure at the Arterial Wall. *Hyperetension* 26: 34-37.
- 15) Aubry MC, Maradit-Kremers H, Reinalda MS, Crowson CS, Edwards WD, Gabriel SE (2007). Differences in atherosclerotic coronary heart disease between subjectswith and without rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 34:937-942.
- 16) Baas AS, Berk BC (1995). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77(1):29-36.
- 17) Balen S, Ružić A, Mirat J, Perišić V (2007). Exercise induced von Willebrand Factor release-New model for routine endothelial testing. *Med Hypotheses* 69:1320-2.
- 18) Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, et al (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416(6878):337-9.
- 19) Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, et al (2006). Investigation of proteinoxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 24(4):307–11.
- 20) Beckman JS, Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, *Am J Physiol* 271 (5Pt1): C1424-C1437.

- 21) Bedard K, Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87(1):245-313.
- 22) Bendayan M (2002). Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability. *Micro res Tech* 57:327-49.
- 23) Beutler E (1982). Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton.
- 24) Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 274:32512-9.
- 25) Bojić M, Đurić D (1997). Endotel u kardiovaskularnoj medicini. Institut za kardiovaskularne bolesti Dedinje, Beograd.
- 26) Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368(6474):850-3.
- 27) Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:168-75.
- 28) Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R (2008). Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 23(3):381-90.
- 29) Book C, Saxne T, Jacobsson LT (2005). Prediction of mortality in rheumatoid arthritis based on disease activity markers *J Rheumatol* 32(3):430-4
- 30) Born G, Schwartz C (1997). *Vascular Endothelium: Physiology, Pathology and Therapeutic Opportunities*. Schattauer, Stuttgart-New York.
- 31) 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(2):179-83
- 32) Brown GC, and Cooper CE (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Letters* 356(2-3):295–298.
- 33) Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (2001), eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th ed. New York, NY: McGraw- Hill.(301, Peter E.Lipsky)

- 34) Bruckdorfer R (2005). The basic about nitric oxide. *Mol Asp Med* 26:3-31.
- 35) Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS (2001). Modulation of catalasa peroxidatic and catalytic activity by nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 7:709-14.
- 36) Burg PJM, Hospres JE, Mosterd WL, et al (2000). Aging, physical conditioning and exercise-induced changes in hemostatic factors and reaction products. *J Appl Physiol* 88:1558-64.
- 37) Burut DF., Karim Y, Ferns GA (2010). The role of immune complexes in atherogenesis. *Angiology* 61 :679–689.
- 38) Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress *Circ Res* 87(10):840-4.
- 39) Canaveri L, Land JM, Clark JB. Stimulation of the brain NO/cyclic GMP pathway by peripheral administration of tetrahydrobiopterin in the hph-1 mouse. *J Neurochem* 1999; 73: 2563-68.
- 40) Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8:691–728.
- 41) Ceaser EK, Moellering DR, Shiva S et al (2004). Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 1):151-5.
- 42) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM et al (1992). Non-invasive detection of endothelial function in children and young adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340: 1111-1115.
- 43) Chambless LE, Folsom AR, Sharrett AR, Sorlie P, Couper D, Szklo M, Nieto FJ (2003) Coronary heart disease risk prediction in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J Clin Epidemiol* 56(9):880-90.
- 44) Chan ES, Cronstein BN (2010). Methotrexate—how does it really work? *Nat. Rev. Rheumatol* 6: 175–178.
- 45) Chatterjee Adhikari M, Guin A, Chakraborty S, Sinhamahapatra P, Ghosh A (2011). Subclinical Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction in Patients with Early Rheumatoid Arthritis as Evidenced by Measurement of Carotid Intima-Media

- Thickness and Flow-Mediated Vasodilatation: An Observational Study. *Semin Arthritis Rheum*
- 46) Chaves PH, Kuller LH, O'Leary DH, Manolio TA, Newman AB (2004) Cardiovascular Health Study Subclinical cardiovascular disease in older adults: insights from the Cardiovascular Health Study. *Am J Geriatr Cardiol*. 13(3):137-51.
  - 47) Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M et al (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling. *Molecular cellular and vascular behavior*. *J Am Coll Cardiol* 49: 2379-93.
  - 48) Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S et al (2001). Tissue factor-a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost* 86:334-45.
  - 49) Choi HK, Hernán MA, Seeger JD, Robins JM, Wolfe F (2002). Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Lancet* 359(9313):1173-7
  - 50) Choi JW (2003). Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity. *Clinica Chimica Acta* 336:83-87.
  - 51) Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I (2000). Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 19: 275-277.
  - 52) Cines DB, Polla ES, Buck CA et al (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-61
  - 53) Clapp BR, Hirschfield GM, Storry C, Gallimore JR, Stidwill RP, et al. (2005). Inflammation and endothelial function: direct vascular effects of human C-reactive protein on nitric oxide bioavailability. *Circulation* 111: 1530–1536.
  - 54) Clark CR, Coull B, Berkman LF, Buring JE, Ridker PM (2011). Geographic variation in cardiovascular inflammation among healthy women in the Women's Health Study. *PLoS One*. 6(11):e27468.
  - 55) C Reactive Protein Coronary Heart Disease Genetics Collaboration (CCGC), Wensley F, Gao P, Burgess S, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Shah T, Engert JC,



- Clarke R Davey-Smith G, et al (2011). Association between C reactive protein and coronary heart disease: mendelian randomisation analysis based on individual participant dataBMJ 342:d548. doi: 10.1136/bmj.d548.
- 56) Cobb S, Anderson F, Bauer W (1952). Length of life and cause of death in rheumatoid arthritis. N Engl J Med 249:553-556.
- 57) Cochrane C (1991). Cellular injury by oxidants. Am J Med 91(3C suppl): 23-30.
- 58) Colin IM, Kopp P, Zbaren J, Haberli A, Grizzle WE, Jameson JL (1997). Expression of nitric oxide synthase III in human thyroid follicular cells: evidence for increased expression in hyperthyroidism.. Eur J Endocrinol. 136:649-55.
- 59) Cooper CE, Lynagh GR, Hoyes KP, Hider RC, Cammack R, Porter JB (1996). The relationship of intracellular iron chelation to the inhibition and regeneration of human ribonucleotide reductase. J Biol Chem 271(34):20291-9.
- 60) Correti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R (2001). Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow mediated vasodilatation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. J Am Coll Cardiol 39(2): 257-65.
- 61) Costenbader H, Kang JH, Karlson EW (2010). Antioxidant intake and risks of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in women. American Journal of Epidemiology 172(2): 205–216.
- 62) Cotgreave IA, Moldeus P and Orrenius S (1988). Host biochemical defence mechanism against prooxidants. Ann Rev Pharmacol Toxicol 28:189-212.
- 63) Coughlin SR (2000). Thrombin signalling and protease activated receptors. Nature 407:258-64.
- 64) Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S (1997). Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. J Mol Cell Cardiol 29:55-65.
- 65) Cynober LA (2002). Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation and metabolic significance. Nutrition 18: 761-66.
- 66) Čepelak I i Dodig S (2004). Glutation i oksidacijski stres. Biochem Med 13:93-100.

- 67) Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 52(4):601-23.
- 68) Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R (1998). Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 279(18):1477-82.
- 69) Davis JM 3rd, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Thorneau TM, Roger VL, Gabriel SE (2007). Glucocorticoids and cardiovascular events in rheumatoid arthritis a population-based cohort study *Arthritis Rheum* 56(3):820-30.
- 70) Daza L, Aguirre M, Jimenez M, Herrera R, Bollain JJ. (2007) Common carotid intima-media thickness and von Willebrand factor serum levels in rheumatoid arthritis female patients without cardiovascular risk factors. *Clin Rheumatol* 26(4):533-7.
- 71) Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115(10):1285-95.
- 72) de Graaf JC, Banga JD, Moncada S et al (1992). Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85:2284-90.
- 73) De Groot H, Littauer A (1989). Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 6(5):541-51.
- 74) de Groot L, Posthumus MD, Kallenberg CG, Bijl M (2010). Risk factors and early detection of atherosclerosis in rheumatoid arthritis *Eur J Clin Invest*. 40(9):835-42
- 75) Dejana E (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:261-70.
- 76) del Rincon I, O'Leary D, Freeman G, Escalante A. (2007) Acceleration of atherosclerosis during the course of rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 195: 354–360.
- 77) del Rincon I, O'Leary DH, Haas RW, Escalante A (2004). Effect of glucocorticoids on the arteries in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:3813–3822.
- 78) Del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A (2003). Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum* 48: 1833–40.

- 79) del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A (2001). High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 44: 2737–2745.
- 80) del Val del Amo N, Ibanez Bosch R, Fito Manteca C, Gutierrez Polo R, Loza Cortina E (2006). Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: relation with disease aggressiveness. *Clin. Exp. Rheumatol* 24: 281–286.
- 81) Demple B (1996). Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon - a review. *Gene* 179(1):53-7.
- 82) de Negris F, Lerman A, Ingaro LJ et al (2003). Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. *Trend Mol Med* 9: 351-59.
- 83) Denis CV (2002). Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol* 75:3-8.
- 84) Dhalla NS, Temsah RS, Netticadan T (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* 18(6):655–673.
- 85) Derhaschnig U, Jilma B (2009). Assessment of platelets and the endothelium in patients presenting with acute coronary syndromes—is there a future? *Thrombosis and Haemostasis* 102( 6):1144–1148.
- 86) Dessein PH, Joffe BI, Singh S (2005). Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7(3):R634-43.
- 87) Dickinson DA, Forman HJ (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019-26.
- 88) Dixon WG, Watson KD, Lunt M, Hyrich KL (2007). British Society for Rheumatology Biologics Register Control Centre Consortium, Silman AJ, Symmons DP; British Society for Rheumatology Biologics Register Reduction in the incidence of myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis who respond to anti-tumor necrosis factor alpha therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register *Arthritis Rheum* 56(9):2905-12
- 89) Djordjević D, Jakovljević V, Cubrilo D, Zlatković M, Zivković V and Djurić D (2010). Coordination between nitric oxide and superoxide anion radical during progressive exercise in elite soccer players. *Open Biochem J* 4:100-106.

- 90) Djuric D, Jakovljevic V, Rasic-Markovic A, Djuric A, Stanojlovic O (2008). Homocysteine, folic acid and coronary artery disease: possible impact on prognosis and therapy. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 50(1):39-48.
- 91) Djurić D, Vusanović A, Jakovljević V (2007). The effects of folic acid and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 300(1-2):177-83.
- 92) Dobs AS, Nieto FJ, Szklo M, Barnes R, Sharrett AR, Ko WJ (1999). Risk factors for popliteal and carotid wall thicknesses in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am J Epidemiol* 150:1055–1067.
- 93) Dröge, W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- 94) Drudzinski DM, Michel T (2007). Life history of eNOS: Patterns and pathways. *Cardiovasc Res* 75: 247-60.
- 95) Dupont GP, Huecksteadt TP, Marchall BC et al (1992). Regulation of xantine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothel cells. *J Clin Invest* 89:197-202.
- 96) Edwards CJ, Syddall H, Goswami R, et al (2007). Rheumatoid factor may be an Independent risk factor for ischaemic heart disease. *Heart* 93(10): 1263-7.
- 97) Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB (1998). Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med* 19(4-5):221-357.
- 98) Elahi MM, Kong YX, Matata BM (2009). Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(5): 259–269.
- 99) Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J (2010). C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality an individual participant meta-analysis. *Lancet* 9;375(9709):132-40.
- 100) Endemann DH, Schiffrin EL (2004). Endothelial dysfunction. *J am soc Nephrol* 15: 1983-92.

- 101) Epperly MW, Defilippi S, Sikora C, Gretton J, Greenberger JS (2002). Radioprotection of lung and esophagus by overexpression of the human manganese superoxide dismutase transgene. *Mil Med* 167(2 Suppl):71-3.
- 102) Ertenli I, Kiraz S, Oztürk MA, Haznedaroğlu I, Celik I, Calgüneri M (2003). Pathologic thrombopoiesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 23(2):49-60.
- 103) Escalante A, Haas RW, del Rincon I (2005). Paradoxical effect of body mass index on survival in rheumatoid arthritis: role of comorbidity and systemic inflammation. *Arch Intern Med* 165:1624-1629.
- 104) Esmon CT (2000). The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* 83:639-43.
- 105) Esmon CT (2000). Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 9:946-55.
- 106) Espeland MA, Hoen H, Byington R, Howard G, Riley WA, Furberg CD (1994). Spatial distribution of carotid intimal-medial thickness as measured by B-mode ultrasonography. *Stroke* 25(9): 1812–1819.
- 107) 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.
- 108) Farragher TM et al (2008). Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 58 :359–369.
- 109) Faulx MD, Wright AT, Hoit BD (2003). Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning. *Am Heart J* 145: 943-951.
- 110) Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Colell A, Morales A, Marí M, Miranda M, Ardite E (1998). Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 8(1-2):7-11.
- 111) Ferrara N (1999). Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top microbiol Immunol* 237: 1-30.

- 112) Fibrinogen Studies Collaboration, Kaptoge S, White IR, Thompson SG, Wood AM, Lewington S, Lowe GD, Danesh J(2007). Associations of plasma fibrinogen levels with established cardiovascular disease risk factors, inflammatory markers, and other characteristics: individual participant meta-analysis of 154,211 adults in 31 prospective studies: the fibrinogen studies collaboration *Am J Epidemiol* 166(8):867-79.
- 113) Firestein GS (2005). Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 11(3 suppl):S39-S44.
- 114) Fischer LM, Schlienger RG, Matter C, et al (2004). Effect of rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus on the risk of first-time acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 93:198–200.
- 115) Forstermann U, Muntzel T (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-14.
- 116) Forstermann U (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 459(6):923-39.
- 117) Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD (1997). Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment *J Clin Invest* 100(2):350-6.
- 118) Freeman BA, White CR, Gutierrez H, Paler-Martínez A, Tarpey MM, Rubbo H (1995). Oxygen radical-nitric oxide reactions in vascular diseases. *Adv Pharmacol* 34:45-69.
- 119) Fridovich I (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112.
- 120) Fridovich I (1997). Superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272(30):18515-7.
- 121) Frostegård J (2010). Rheumatic Diseases. Insights Into Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc. Bio* 30: 892-3.
- 122) Fuchs I, Frossard M, Spiel A, Riedmuller E, Laggner AN, Jilma B. (2006) Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS. *J Thromb Haemost* 4:2547–2552.

- 123) Furchgot RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-76.
- 124) Gambhir JK, Lali P, Jain AK (1997). Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 30:351-355.
- 125) Garcia-Bermudez M, González-Juanatey C, Lopez-Mejias R, Rodriguez-Rodriguez L, Pérez-Esteban S, Castañeda S, Urcelay E, Miranda-Filloo JA, Gómez-Vaquero C, Fernández-Gutierrez B, Balsa A, González-Alvaro I, Blanco R, Llorca J, Martín J, Gonzalez-Gay MA (2012). Influence of MHCIIA rs3087456 and rs4774 polymorphisms in the susceptibility to cardiovascular disease of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*
- 126) Gardner PR, Fridovich I (1991). Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *J Biol Chem* 266(29):19328-33.
- 127) Georgiadis AN, Voulgari PV, Argyropoulou MI, Alamanos Y, Elisaf M, Tselepis AD, Drosos AA (2008). Early treatment reduces the cardiovascular risk factors in newly diagnosed rheumatoid arthritis patients. *Semin Arthritis Rheum* 38:13-19.
- 128) Gerli R, Bartoloni Bocci E, Sherer Y, Vaudo G, Moscatelli S, Shoenfeld Y (2008). Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies with subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67(5):724-5.
- 129) Gerli R, Sherer Y, Vaudo G, et al (2005). Early atherosclerosis in rheumatoid arthritis: Effects of smoking on thickness of the carotid artery intima media. *Ann NY Acad Sci* 1051:281–290.
- 130) Gonzalez A, Icen M, Kremers HM, Crowson CS, Davis JM 3rd, Thorneau TM, Roger VL, Gabriel SE (2008) Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. *J. Rheumatol.* 35:1009–1014.
- 131) Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Davis JM, Thorneau TM, et al. The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3583-3587.
- 132) Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Vazquez-Rodriguez TR, Miranda-Filloo JA, Gonzalez-Juanatey C, de Matias JM, Martin J, Dessein PH, Llorca J (2009). Short-term effect of anti-TNF-alpha therapy on nitric oxide

- production in patients with severe rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 27(3):452-8
- 133) Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Diaz MJ, Piñeiro A, Garcia-Porrúa C, Miranda-Filloy JA, Ollier WE, Martin J, Llorca J (2007). HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50(1):125-32.
- 134) Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Martin J, Llorca J (2008). Endothelial dysfunction, carotid intima-media thickness, and accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 38(2): 67-70.
- 135) Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Garcia-Porrúa C, Martin J, Gonzalez-Gay MA (2006). Effect of anti-tumor necrosis factor alpha therapy on the progression of subclinical atherosclerosis in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 55:150-153.
- 136) González-Juanatey C, Llorca J, González-Gay MA (2011) Correlation between endothelial function and carotid atherosclerosis in rheumatoid arthritis patients with long-standing disease. *Arthritis Res Ther* 13(3):R101.
- 137) Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA (2003). Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease. *Medicine (Baltimore)* 82(6): 407-13.
- 138) Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Martin J, Gonzalez-Gay MA. (2009). Carotid intima media thickness predicts the development of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 38(5): 366-71.
- 139) Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, Martín J, Gonzalez-Gay MA (2006). Steroid therapy improves endothelial function in patients with biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 33(1): 74-8.
- 140) Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA (2003). Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings



- in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease. *Medicine (Baltimore)* 82: 407-13.
- 141) Gonzalez-Juanatey C, Pineiro A, Garcia-Porrúa C, Testa A, Llorca J (2005). High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32: 1219-23.
- 142) Gonzalez-Juanatey C, Testa A, Garcia-Castelo A, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Vidan J, Hajeer AH, Ollier WE, Matthey DL, Gonzalez-Gay MA (2003). HLA-DRB1 status affects endothelial function in treated patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 114(8):647-52.
- 143) Goodson N (2002). Coronary artery disease and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 14:115-120.
- 144) Goodson NJ, Symmons DP, Scott DG, Bunn D, Lunt M, Silman A (2005). Baseline levels of C-reactive protein and prediction of death from cardiovascular disease in patients with inflammatory polyarthritis: a ten-year followup study of a primary care-based inception cohort. *Arthritis Rheum* 52:2293-2299.
- 145) Goodson NJ, Wiles NJ, Lunt M, et al (2002). Mortality in early inflammatory polyarthritis: cardiovascular mortality is increased in seropositive patients. *Arthritis Rheum* 46:2010–2019.
- 146) Gosch S, Kain M (2002). Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* 109: S81-S96.
- 147) Grabowski PS, Wright PK, van't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH (1997). Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 36: 651–5.
- 148) Green LC, Wagner, DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [ $^{15}$ N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- 149) Greenberg JD et al (2011). Tumour necrosis factor antagonist use and associated risk reduction of cardiovascular events among patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis* 70, 576–582.

- 150) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30: 1205–1213.
- 151) Griendling KK, Fitzgerald GA (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic Mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912-16.
- 152) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74(6):1141-8.
- 153) Griendling KK, Ushio-Fukai M (1998). Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med* 132(1):9-15.
- 154) Gross PL, Aird WC (2000). The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 26:463-78.
- 155) Gross M, Steffes M, Jacobs DR Jr, Yu X, Lewis L, Lewis CE, et al (2005). Plasma F2-isoprostanes and coronary artery calcification: the CARDIA Study. *Clin Chem* 51(1):125–31.
- 156) Grover S, Sinha RP, Singh U, Tewari S, Aggarwal A, Misra R (2006). Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis in India. *J Rheumatol* 33: 244–7.
- 157) Groves PH, Banning AP, Pennz WJ et al (1995). The effects of exogenous nitric oxide on smooth muscle cell proliferation following porcine carotid artery anoplasty. *Cardiovasc Res* 30: 87-96.
- 158) Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith SJr, Fuster V (1999). Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 100: 1481–1492.
- 159) Hahn BH, Grossman J, Chen W, McMahon M (2007). The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmunerheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia. *J Autoimmun* 28(2-3):69–75.
- 160) Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L et al (2001). Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J physiol Heart Circ Physiol* 280:H2470-7.

- 161) Halliwell B and Gutteridge JMC (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*, First edition, Clarendon Press, Oxford.
- 162) Halliwell B, and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press.
- 163) Halliwell B, Rafter J, Jenner A (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidants or not? *Am J Clin Nutr* 81(suppl):268S-76S.
- 164) Hamilton CA, Miller WH, Al-Benna S, Brosnan MJ, Drummond RD, McBride MW, Dominiczak AF (2004). Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin Sci* 106:219-234.
- 165) Hamon M, Vallet B, Bauters C et al (1994). Long-term oral administration of L-arginin reduces intimal thickening and enhances neoendothelium dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury. *Circulation* 90: 1357-62
- 166) Hannawi S, Haluska B, Marwick TH, Thomas R (2007). Atherosclerotic disease is increased in recent-onset rheumatoid arthritis: a critical role for inflammation. *Arthritis Res Ther* 9:R116.
- 167) Hansson GK (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-95.
- 168) Haram PM (2006). Genetic vs. acquired fitness: metabolic, vascular and cardiomyocyte adaptations. Doctoral thesis. Faculty of Medicine, Trondheim: Norwegian University of Science and Technology.
- 169) Harris ED, Budd RC, Genovese MC, Firestein GC, Sargent JS, Sledge CB (2005). eds *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders; (Section VIII, 64-67)
- 170) Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS (2011). Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity *Int J Rheum Dis* 14(4):325-31. doi: 10.1111/j.1756-185X.2011.01630.x.
- 171) Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, Etani H, Hori M (2006). C-reactive protein predicts carotid atherosclerosis progression in mild to moderate risk and middle-aged patients. *Clin Invest Med* 29(2): 77-82.

- 172) Henderson LM, Chappel JB (1996). NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1273(2):87-107.
- 173) Hennerici M, Meairs S (2000) Imaging arterial wall disease. *Cerebrovasc Dis.* 2000;10 Suppl 5:9-20.
- 174) Hermann C, Assmus B, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S (2000). Insulin mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 402 – 409.
- 175) Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73(3):411-8.
- 176) Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6(6):265–78.
- 177) Hochberg MC, Johnston SS, John AK (2008). The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Curr. Med. Res. Opin* 24: 469–480.
- 178) Holmes MV, Jiang B, McNeill K, Wong M, Oakley SP, Kirkham B, Chowienczyk PJ (2010). Paradoxical association of C-reactive protein with endothelial function in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 5(4):e10242.
- 179) Honkanen V, Kontinen YT, Mussalo-Rauhamaa H (1989). Vitamins A and E, retinol binding protein and zinc in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 7(5):465-9.
- 180) Hood JD, Meininger CJ, Ziche M et al (1998). VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274:H1054-58.
- 181) Hurd TR, Murphy MP (2009). Introduction In: Jacob C, Winyard PG, editors. *Redox signaling and regulation in biology and medicine*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH&Co; p. 13-40.
- 182) Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B, et al (2001). Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: Possible

- contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis Rheum* 44: 2761-2767.
- 183) Hussain SP, Hofseth LJ, Harsi CC (2003). Radical causes of cancer. *Nature Rev Cancer* 3:276-85.
- 184) Hynes RO (1992). Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
- 185) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS et al (1987). Endothelium derived relaxing factor released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9265-69.
- 186) Ikonomidis I, Tzortzis S, Lekakis J, Paraskevaidis I, Andreadou I, Nikolaou MKaplanoglou T, Katsimbri P, Skarantavos G, Soucacos P, Kremastinos DT (2009). Lowering interleukin-1 activity with anakinra improves myocardial deformation in rheumatoid arthritis *Heart* 95(18):1502-7.
- 187) Innala L, Möller B, Ljung L, Magnusson S, Smedby T, Södergren A, Öhman ML, Rantapää-Dahlqvist S, Wållberg-Jonsson S (2011). Cardiovascular events in early RA are a result of inflammatory burden and traditional risk factors: a five year prospective study *Arthritis Res Ther* 13(4):R131.
- 188) Ingegoli F, Fantini F, Griffini S, Soldi A, Meroni PL, Cugno M (2010). Anti-tumor necrosis factor alpha therapy normalizes fibrinolysis impairment in patients with active rheumatoid arthritis *Clin Exp Rheumatol* 28(2):254-7.
- 189) Jacobsson LT et al (2001). Joint swelling as a predictor of death from cardiovascular disease in a population study of Pima Indians. *Arthritis Rheum* 44: 1170–1176.
- 190) Jakovljevic VLj, Canovic PS, Andjelkovic NV, Djuric DM (2006). The effects of nimodipine and L-NAME on coronary flow and oxidative stress parameters in isolated rat heart. *Acta Physiol Hung* 93(4):251-61.
- 191) Jakovljevic VLj, Djordjevic DZ, Djuric DM (2011). The effects of vitamin C and nitric oxide synthase inhibition on coronary flow and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Gen Physiol Biophys* 30(3):293-300.
- 192) Jakovljević VLj, Zlatković M, Cubrilo D, Pantić I, Djurić DM (2011). The effects of progressive exercise on cardiovascular function in elite athletes: focus on oxidative stress. *Acta Physiol Hung* 98(1):51-8.

- 193) Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, et al. (1995) Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation* 91: 1314–1319.
- 194) Jonsson SW, Backman C, Johnson O, et al (2001). Increased prevalence of atherosclerosis in patients with medium term rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 2597-602.
- 195) Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiha M et al (2002). Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 38:765–72.
- 196) Kageyama Y, Takahashi M, Ichikawa T, Torikai E, Nagano A (2008). Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF-alpha antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. *ClinExp Rheumatol* 26(1):73–80.
- 197) Kamanli A, Naziroğlu M, Aydilek N, Hacıevliyagil C (2004). Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct* 22(1):53–7.
- 198) Karlson EW, Shadick NA, Cook NR, Buring JE, Lee IM (2008). Vitamin E in the primary prevention of rheumatoid arthritis: the women's health study. *Arthritis Care and Research*. 59(11): 1589–1595.
- 199) Karppi J, Nurmi T, Kurl S, Rissanen TH, Nyssönen K (2010). Lycopene, lutein and beta-carotene as determinants of LDL conjugated dienes in serum. *Atherosclerosis* 209(2):565-72.
- 200) Kato H (2002). Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: Basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:539-48.
- 201) Kedzierski BM, Yanagisawa M (2001). Endothelin system: the double-edge sword in health and disease. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 280:H2470-7.
- 202) Kehrer JP, Lund LG (1994). Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17(1):65-75.
- 203) Kerekes G et al (2008). Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J. Rheumatol* 35: 398–406.

- 204) Khan F, Galarraga B, Belch JJ (2010). The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6(5):253-61.
- 205) Khovidhunkit W (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: Mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45: 1169-1196
- 206) Kidd PM (1997). Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev* 2:155-176.
- 207) Kiechl S, Willeit J (1999). The natural course of atherosclerosis. PartII: Vascular remodeling. Bruneck Study Group. *ArteriosclerosisThromb Vasc Biol* 19:1491–1498.
- 208) Klein CL, Bittinger F, Skarke CC et al (1995). Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology* 63:204-12.
- 209) Koenig W, Sund M, Frohlich M, et al (1999). C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99:237-242.
- 210) Kremers HM, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE (2004). Prognostic importance of low body mass index in relation to cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:3450-3457.
- 211) Kumeda Y, Inaba M, Goto H, et al (2002). Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46:1489–1497.
- 212) Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651-5.
- 213) Ku IA, Imboden JB, Hsue PY, Ganz P (2009). Rheumatoid arthritis: model of systemic inflammation driving atherosclerosis *Circ J* 73(6):977-85.
- 214) Kwon HJ, Coté TR, Cuffe MS, Kramer JM, Braun MM (2003). Case reports of heart failure after therapy with a tumor necrosis factor antagonist. *Ann Intern Med* 138(10):807-11.

- 215) Lamas S, Marsden PA, Li GK et al (1992). Endothelial nitric oxide synthase:molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform.ProcNatl.Acad.Sci USA 89:6348-52.
- 216) Lam CF, Peterson TE, Richardson DM et al (2006). Increased blood flow causes coordinated upregulation of arterial eNOS and biosynthesis of tetrahydrobiopterin. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290:H786-93.
- 217) Lačković V,Bumbaširević V (2006). Svetlosne i elektronsko-mikroskopske karakteristike normalnog endotela. U knjizi:Nedeljković SI, Kanjuh VI, Vukotić MR. Kardiologija, III izdanje,I tom. Izd“Beograd“.Beograd.
- 218) Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2004) Endothelial function: a criticaldeterminant in atherosclerosis? Circulation 109: II27–33.
- 219) Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. Circulation 97:1129-35.
- 220) Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD (2005). Circulating endothelial cells, von Willebrand factor,interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. Blood 105( 2): 526–532.
- 221) Lelchuk R, Radomski MW, Martin JF, Moncada S (1992). Constitutive and inducible nitric oxide synthases in human megakaryoblastic cells. Pharmacol Exp Ther. 262:1220-24.
- 222) Liang KP, Kremers HM, Crowson CS, Snyder MR, Therneau TM, Roger VL, Gabriel SE (2009). Autoantibodies and the risk of cardiovascular events. J. Rheumatol 36:2462–2469.
- 223) Libby P (2008). Role of inflammationin atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis.Am J Med 121(Suppl 1):S21-S31.
- 224) Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002). Inflammation and atherosclerosis. Circulation 105: 1135-1143.
- 225) Listing J, Strangfeld A, Kekow J, Schneider M, Kapelle A, Wassenberg S, Zink A (2008). Does tumor necrosis factor alpha inhibition promote or prevent heart failure in patients with rheumatoid arthritis? Arthritis Rheum 58(3):667-77.



- 226) Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR Jr (1998). Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 273(30):18709-13.
- 227) Liu Y, Chen BP, Lu M et al (2002). Shear stress activation of SREBp1 in endothelial cells is mediated by integrins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:76-81.
- 228) Lopez-Longo FJ et al (2009). Association between anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and ischemic heart disease in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 61: 419–424.
- 229) Loscalzo J, Welch G (1995). Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovascular Dis* 38:87-104.
- 230) Lo YY, Wong JM, Crus TF (1996). Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 271(26):16703-7.
- 231) Ludwig M, von Petzinger-Kruthoff A, von Buquoy M, Stumpe KO (2003). Intima media thickness of the carotid arteries: early pointer to arteriosclerosis and therapeutic endpoint. *Ultraschall Med*.24(3):162-74.
- 232) Macías I, García-Pérez S, Ruiz-Tudela M, Medina F, Chozas N, Girón-González JA (2005). Modification of pro- and antiinflammatory cytokines and vascular-related molecules by tumor necrosis factor- $\alpha$  blockade in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32(11):2102-8.
- 233) Magid R, Murphy TJ, Galis ZS (2003). Expression of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells is differentially regulated by shear stress. Role of c-Myc. *J Biol Chem* 278: 32994-9.
- 234) Malek AM, Alper SL, Izumo S (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282: 2035-42.
- 235) Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al (2005). Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: A population-based cohort study. *Arthritis Rheum* 52: 402-411.

- 236) Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005). Novel mechanisms of natural antioxidants compounds in biological systems. Involvement of glutathione and glutathione related enzymes. *J Nutr Biochem* 16:577-586.
- 237) Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106(12):1521-30.
- 238) Mathey DL et al (2007). Association of DRB1 shared epitope genotypes with early mortality in rheumatoid arthritis: results of eighteen years of followup from the early rheumatoid arthritis study. *Arthritis Rheum* 56: 1408–1416.
- 239) Matsunaga T, Weichrauch DW, Monitz MC et al (2002). Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation* 105:2185-2191.
- 240) Matsushita K, Morrell CN, Mason RJA et al (2005). Hydrogenperoxide regulation of endothelial exocytosis by inhibition of N-ethylmaleimide sensitive factor. *Journal of Cell Biology* 170 (1) : 73–79.
- 241) Mayer B, and Hemmens B (1997). Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22(12):477-481.
- 242) Maziere C, Auclair M, Maziere JC (1994). Tumor necrosis factor enhances low density lipoprotein oxidative modification by monocytes and endothelial cells. *FEBS Lett* 338: 43-46.
- 243) McCord JM, Fridovich I (1969). Superoxid dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *J Bio Chem* 244:6049-55.
- 244) McEntegart A, Capell HA, Creran D, Rumley A, Woodward M, Lowe GD (2001). Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 40(6):640-4.
- 245) McEver RP, Beckstead JH, Moore KL et al (1989). GMP-140, a platelet alpha granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84:92-99.
- 246) McInnes I, Schett G (2011). The Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365:2205-19.

- 247) McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Hlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, et al (2006). Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(8):2541–9.
- 248) McMahon M, Grossman J, Skaggs B, FitzGerald J, Sahakian L, Ragavendra N, et al (2009). Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60(8):2428–37.
- 249) McNally JS, Davis ME, Giddens DP et al (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NADPH oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H2290-7.
- 250) McNeil CJ, Banford JC, Brown DH, Smith WE (1981). A relationship between thiols and the superoxide ion. *FEBS Lett* 133(1): 175-7.
- 251) Meister A (1995). Glutathione biosynthesis and its inhibition. *Methods Enzymol* 252:26-30.
- 252) Meister A, Anderson ME (1993). Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:710-60.
- 253) Meune C, Touze E, Trinquart L, and Allanore Y. (2009) Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years a systemic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)* 48:1309-1313
- 254) Michel JB, Feron O, Sacks D, et al (1997). Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and calveolin. *J Biol Chem* 272:15583-6.
- 255) Michiels C (2003). Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196:430-43.
- 256) Milsten S, Katusic Z (1999). Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 681-84.
- 257) Misra HP, Fridovich I (1972). The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175.
- 258) Mizia-Stec K (2006). Cytokines and adhesive molecules in detection of endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep* 58 Suppl:21-32.

- 259) Mohan S, Hamuro M, Sorecu GP et al (2003). I kappa B alpha-dependent regulation of low shear flow-induced NF-kappa B activity: role of nitric oxide. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1039-47.
- 260) Moncada S, Erusalimsky JD (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 214-20.
- 261) Moncada S (1999). Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med* 92(4):164-169.
- 262) Montuschi P, Barnes P, Roberts LJ (2007). Insights into oxidative stress: the isoprostanes. *Curr Med Chem* 14(6):703-17.
- 263) Moreland LW, O'Dell JR (2002). Glucocorticoids and rheumatoid arthritis: back to the future? *Arthritis Rheum* 46(10):2553-63.
- 264) Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ 2nd (1992). The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 44(2):155-63.
- 265) Mujović VM (1998). Autakoidni sistem. Nauka, Beograd.
- 266) Muller WA (2002). Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 82: 521-33.
- 267) Myasoedova E et al (2011). Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease. *Ann. Rheum. Dis* 70: 482-487 .
- 268) Nagata-Sakurai M, Inaba M, Goto H, et al (2003). Inflammation and bone resorption as independent factors of accelerated arterial wall thickening in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 3061-7.
- 269) Nagy, A. Koncz, T. Telarico et al (2010). Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy* 12(3): 210.
- 270) Naranjo A, Sokka T, Descalzo MA, Calvo-Alén J, Hørslev-Petersen K, Luukkainen RK, Combe B, Burmester GR, Devlin J, Ferraccioli G, Morelli A, Hoekstra M, Majdan M, Sadkiewicz S, Belmonte M, Holmqvist AC, Choy E, Tunc R, Dimic A, Bergman M, Toloza S, Pincus T (2008) QUEST-RA Group Cardiovascular disease

- in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis Res Ther* 10(2):R30.
- 271) Naseem KM (2005). The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Asp Med* 26:33-65.
- 272) Nicholls DG (2004). Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* 3(1):35-40.
- 273) Nickel R, Beck LA, Stellato C et al (1999). Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 104: 723-42.
- 274) Nicola PJ, Maradit-Kremers H, Roger VL, Jacobsen SJ, Crowson CS, Ballman KV, et al (2005). The risk of congestive heart failure in rheumatoid arthritis: A population-based study over 46 years. *Arthritis Rheum* 52: 412-420.
- 275) Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 338(1):668-76.
- 276) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
- 277) O’Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al (1992). Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Stroke* 23:1752–1760.
- 278) Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y and Taniguchi N (1992). Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn superoxide dismutase by glycation reaction: implication of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 267:18505–18510.
- 279) Oury TD, Day BJ and Crapo JD (1996). Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 75: 617–636.
- 280) Ozkan Y, Yardym-Akaydyn S, Sepici A, Keskin E, Sepici V, Simsek B (2007). Oxidative status in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26(1):64–8.
- 281) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-26.
- 282) Paredes S, Girona J, Hurt-Camejo E, Vallve JC, Olive S, Heras M, Benito P, Masana L (2002). Antioxidant vitamins and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis: association with inflammatory markers. *J Rheumatol* 29:2271-2277.

- 283) Pasceri V, Yeh ET (1999). A tale of two diseases: Atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 100:2124-2126.
- 284) Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102:2165-8
- 285) Pasterkamp G, Galis ZS, de Kleijn DPV (2004). Expansive arterial remodeling: Location, location, location. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 24:650–657.
- 286) Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL (1980). Metabolism of adenine nucleotides by ectozymes of vascular endothelial and smooth muscle cells in culture. *Biochem J* 190:419-21.
- 287) Pearson JD (1999). Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Nematol* 12:329-41.
- 288) Percival M (1996). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights; Advanced Nutrition Publications Inc.*
- 289) Pernerstorfer T, Stohlawetz P, Kapiotis S, Eichler HG, Jilma B (2000). Partial inhibition of nitric oxide synthase primes the stimulated pathway of VWF-secretion in man. *Atherosclerosis* 148 (1) : 43–47.
- 290) Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, et al (2010). EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 69(2): 325-31.
- 291) Peters MJ, van Halm VP, Voskuyl AE, Smulders YM, Boers M, Lems WF, Visser M, Stehouwer CD, Dekker JM, Nijpels G, Heine R, Dijkmans BA, Nurmohamed MT (2009). Does rheumatoid arthritis equal diabetes mellitus as an independent risk factor for cardiovascular disease? A prospective study. *Arthritis Rheum* 61(11):1571-9
- 292) Petkau A (1986). Scientific basis for the clinical use of superoxide dismutases. *Cancer Treat Rev* 13(1):17-44
- 293) Petri M, Lakatta C, Magder L, Goldman D (1994). Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. *Am J Med* 96:254-259.
- 294) Pick E, Keisari Y (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161-70.

- 295) Pincus T, Callahan LF (1986). Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously-- predictive markers, socioeconomic status and comorbidity. *J Rheumatol* 13(5):841–5.
- 296) Pober JS, Cotran RS (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70:427-51.
- 297) Profumo E, Buttari B, Tosti ME, et al (2008). Subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid and psoriatic arthritis in *Autoimmunity: Role, Regulation and Disorders*, F.L. Vogel and L. F. Zimmermann, Eds., Nova Science.
- 298) Pryor WA, Squadrito GL (1995). The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268(5 Pt 1):L699-722.
- 299) Quyyumi A (2003). Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol* 91(suppl):19H-24H.
- 300) Radak Đ, Maravić-Stojković V (2006). *Imunologija u genezi i terapiji ateoskleroze*. Beograd.
- 301) Recommendations for use of selective and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs (2008). an American College of Rheumatology white paper. *Arthritis Rheum* 59(8):1058-73
- 302) Reiss AB, et al (2008). Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum* 58: 3675–3683.
- 303) Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus JF, Gebretsadik T, Shintani A, Raggi P, Milne GL, Stein CM (2010). Interaction between oxidative stress and high-density lipoprotein cholesterol is associated with severity of coronary artery calcification in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62(10):1473-80.
- 304) Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336: 973–979.
- 305) Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000). C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 342:836–43.

- 306) Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND (2005). A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 98:203-10
- 307) Rodríguez-Rodríguez L, González-Juanatey C, García-Bermúdez M, Vázquez-Rodríguez TR, Miranda-Filloo JA, Fernández-Gutiérrez B, Llorca J, Martin J, González-Gay MA (2011). CCR5 $\Delta$ 32 variant and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a cohort study. *Arthritis Res Ther* 13(4): R133.
- 308) Rodríguez-Rodríguez L, González-Juanatey C, Palomino-Morales R, Vázquez-Rodríguez TR, Miranda-Filloo JA, Fernández-Gutiérrez B, Llorca J, Martin J, González-Gay MA (2011). TNFA -308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 216(1): 125-30.
- 309) Rojas-Villarraga A, Ortega-Hernandez OD, Gomez LF, Pardo AL, López-Guzmán S, Arango-Ferreira C, Hincapie ME, Betancur JF, Pineda-Tamayo R, Diaz FJ, Anaya JM (2008). Risk factors associated with different stages of atherosclerosis in Colombian patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 38(2):71-82.
- 310) Rollins BJ (1997). Chemokines. *Blood* 90:909-28.
- 311) Roman MJ, Moeller E, Davis A, et al (2006). Preclinical carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 144:249–256.
- 312) Ross R (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
- 313) Ross R (1997). Pathogenesis of Atherosclerosis. In *Heart Disease: A textbook of Cardiovascular Medicine*. Braunwald E.Ed. 1105-25. The W B Saunders Company, Philadelphia.
- 314) Ruggeri ZM, Preisner KT (1999). Structure and function of von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 82:576-84.
- 315) Sadler JE (1997). Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost* 78:392-95.



- 316) Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL, Jones DP (1998). Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 24(5):699-704.
- 317) Sandri G, Panfili E, Ernster L (1990). Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and  $\text{Ca}^{2+}$  efflux. *Biochim Biophys Acta* 1035(3):300-5.
- 318) Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE (2005). Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 38(11):981-6.
- 319) Satoh K, Berk BC, Shimokawa H (2011). Vascular-derived reactive oxygen species for homeostasis and diseases. *Nitric Oxide* 25(2):211-5.
- 320) Sattar N (2004). Inflammation and endothelial dysfunction: intimate companions in the pathogenesis of vascular disease? *Clin Sci (Lond)* 106(5):443-5.
- 321) Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB (2003). Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk i rheumatoid arthritis. *Circulation* 108(24):2957-63.
- 322) Schnitzer JE (1993). Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability. *Trends Cardiovascular Med* 3:124-30.
- 323) Schultz JB, Kindeanau J and Dichgans J (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur . Biochem* 267:4904-4911.
- 324) Sen CK, Packer L (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 72:653S-69S.
- 325) Sevanian A, Davies KJA, Hochstein P (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 54:1129S-34S.
- 326) Shafirovich V, Lyamar SV (2002). Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(11):7340-5.
- 327) Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A (2011). Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 216(9):1010-7.

- 328) Shaul PW (2002). Regulation of endothelial Nitric Oxide Synthase:location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64:749-74.
- 329) Sherer Y, Shoenfeld Y (2006). Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(2):99-106
- 330) Schott LL, Kao AH, Cunningham A, Wildman RP, Kuller LH, Sutton-Tyrrell K, Wasko MC (2009). Do carotid artery diameters manifest early evidence of atherosclerosis in women with rheumatoid arthritis? *J Womens Health (Larchmt)*. 18(1):21-9.
- 331) Shiva S, Moellering D, Ramachandran A, Levenon AL, Landar A, Venkatraman A, et al (2004). Redox signalling: from nitric oxide to oxidized lipids. *Biochem Soc Symp* (71):107-20.
- 332) Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Sciuto S, Geremia E (1987). Relation ship between melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochem Funct* 5(2): 123-8.
- 333) Sidelmann JJ, Gram J, Jaspersen J et al (2000). Fibrin clot formation and lysis:Basic mchanisms. *Semin Thromb Hemost* 26:605-18.
- 334) Sies H (1985). Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H, editor. *Oxidative Stress*. New York: Academic Press, p. 1-8.
- 335) Sitia S, Tomasoni I, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M (2010). From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 9(12): 830-4.
- 336) Slager CJ, Wentzel JJ, Gijzen FJ et al (2005). The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2:401-7.
- 337) Smolen JS, et al (2010). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis* 69: 964–975.
- 338) Södergren A, Karp K, Boman K, Eriksson C, Lundström E, Smedby T, Söderlund LRantapää-Dahlqvist S, Wällberg-Jonsson S (2010). Atherosclerosis in early

- rheumatoid arthritis: very early endothelial activation and rapid progression of intima media thickness. *Arthritis Res Ther.*12(4):158-166.
- 339) Solomon DH, Avorn J, Katz JN, Weinblatt ME Setoguchi S, Levin R, Schneeweiss S (2006). Immunosuppressive medications and hospitalization for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(12):3790-8.
- 340) Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, et al (2003). Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 107:1303–1307
- 341) Solomon DH, et al (2010). Explaining the cardiovascular risk associated with rheumatoid arthritis: traditional risk factors versus markers of rheumatoid arthritis severity. *Ann. Rheum. Dis* 69: 1920–1925.
- 342) Spiel AO, Gilbert JC, Jilma B (2008). von Willebrand factor in cardiovascular disease: focus on acute coronary syndromes. *Circulation* 117(11):1449-1459.
- 343) Spiteller P, Spiteller G (1998). Strong dependence of the lipid peroxidation product spectrum whether  $Fe_2^+/O_2$  or  $Fe_3^+/O_2$  is used as oxidant. *Biochim Biophys Acta* 1392(1):23-40.
- 344) Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76:301-14.
- 345) Stamler JS, and Hausladen A (1998). Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nature Structural Biology* 5:247-249.
- 346) Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001). Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106:675-83.
- 347) Starčević VP, Mujović VM, Jocić Z, Radovanović N, Vuković S (1984). Homeostasis of prostacyclin ( $PGI_2$ ) and tromboxane ( $TXA_2$ ) in human arterial and venous blood. *Acta Biol Med Exp* 9: 25-8.
- 348) Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ (1992). Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem* 267(19):13425-33.
- 349) Steinberg D (2009). The LDL modification hypothesis of atherogenesis:an update . *Journal of Lipid Research* 50 . S376–S381.

- 350) Steiner G, Urowitz MB (2009). Lipid profiles in patients with rheumatoid arthritis mechanisms and the impact of treatment. *Semin Arthritis Rheum* 38:372-381.
- 351) Stocker R, Keaney JF Jr (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84(4):1381–478.
- 352) Stone PH, Coskun AU, Kinlay S et al (2003). Effect of endothelial shear stress on the progression of coronary artery disease, vascular remodeling and in-stent restenosis in humans: in vivo 6-month follow-up study. *Circulation* 108:438-44.
- 353) Storz G, Tartaglia LA, Ames BN (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248(4952):189-94.
- 354) St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD (2002). Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *J Biol Chem* 277(47):44784–44790.
- 355) Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 279(35):36167-70.
- 356) Suissa S, Bernatsky S, Hudson M (2006). Antirheumatic drug use and the risk of acute myocardial infarction *Arthritis Rheum* 55(4):531-6.
- 357) Superko HR, Gadesam RR (2008). Is it LDL particle size or number that correlates with risk for cardiovascular disease? *Curr Atheroscler Rep* 10(5): 77-85.
- 358) Su WH, Chen H, Huang H et al (2000). Endothelial Ca signaling during transmigration of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 96: 3816-22.
- 359) Svensson B, Hafström I (2011). Effects on joint destruction and remission, bone turnover and lack of influence on atherogenesis: a review of the BARFOT low-dose prednisolone studies on patients with early RA. *Clin Exp Rheumatol* 29(5 Suppl 68): S63-7.
- 360) Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L et al (2001). Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 38: 274-79.
- 361) Taniguchi N (1992). Clinical significances of superoxide dismutases: changes in aging, diabetes, ischemia and cancer. *Adv Clin Chem* 29:1–59.
- 362) Taniyama Y, Griendling KK (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms *Hypertension* 42(6):1075-81.

- 363) Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, Yamagishi H, Ohashi J, Yada T, Yanagihara N, Shimokawa H (2008). Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med* 205(9):2053-63.
- 364) Takase B, Uehata A, Akima T et al (1998). Endothelium-dependent flow-mediated vasodilatation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol* 82:1535-1539.
- 365) Targońska-Stepniak B, Drelich-Zbroja A, Majdan M (2011). The relationship between carotid intima-media thickness and the activity of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 17(5):249-55.
- 366) Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E (2002). Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 21:200-204.
- 367) Tomasson G, Aspelund T, Jonsson T, Valdimarsson H, Felson DT, Gudnason V. (2010). Effect of rheumatoid factor on mortality and coronary heart disease. *Ann. Rheum. Dis.* 69: 1649–1654 .
- 368) Toms TE, et al (2011). Rheumatoid arthritis susceptibility genes associate with lipid levels in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis* 70, 1025–1032.
- 369) Tousolis D, Antoniadis C, Bosinakou E, Kotsopoulou M, Tsoufis C, Marinou K, Charakida M, Stefanadi E, Vavuranakis M, Latsios G, Stefanadis C (2007). Differences in inflammatory and thrombotic markers between unstable angina and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 115:203-207.
- 370) Tyrrell P, Beyene J, Feldman B, McCrindle B, Silverman E, Bradley T (2010). Rheumatic Disease and Carotid Intima-Media Thickness A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(5): 1014-26.
- 371) 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.
- 372) Uhlig S, Wendel A (1992). The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sciences* 51:1083-94.

- 373) Upston JM, Terentis AC, Morris K et al (2002). Oxidized lipid accumulates in the presence of alpha-tocopherol in atherosclerosis. *Biochem J* 363: 753-9.
- 374) Yang SX, Yan J, Deshpande SS, Irani K, Lowenstein CJ (2004). Rac1 regulates the release of Weibel-Paladebodies in human aortic endothelial cells. *Chinese Medical Journal* 117( 8): 1143–1150.
- 375) Valenzuela A, et al (1999). Association of HLA shared epitope with joint damage progression in rheumatoid arthritis. *Hum. Immunol.* Mar 60: 250–254.
- 376) Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, et al (2003). Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 420(2): 255–261.
- 377) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1):44-84.
- 378) Vallance P, Collier J, Bhagat K (1997). Infection, inflammation, and infarction: Does acute endothelial dysfunction provide a link? *Lancet* 349: 1391 – 1392.
- 379) Van Doornum S, McColl G, Jenkins A, Green DJ, Wicks IP (2003). Screening for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis: comparison of two in vivo tests of vascular function. *Arthritis Rheum* 48: 72–80.
- 380) van Halm VP, Nielen MM, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl AE, Twisk JW, van de Stadt RJ, de Koning MH, Habibuw MR, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BA (2007). Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:184-188.
- 381) van Halm VP, Nurmohamed MT, Twisk JW, Dijkmans BA, Voskuyl AE (2006). Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study *Arthrit Res Ther* 8(5):R151.
- 382) Vanhoutte PM (2011). Endothelium-derived free radicals: for worse and for better. *J Clin Invest* 107(1):23-5.

- 383) Vanhoutte PM (2009). Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J* 73(4):595-601.
- 384) Vanhoutte PM (2000).. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 81:271–7.
- 385) Van Lenten BJ, Reddy ST, Navab M, Fogelman AM (2006). Understanding changes in high density lipoproteins during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1687-1688..
- 386) van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H (2003). Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 423(6941):773-7.
- 387) van Mourik JA, Romain de Wit T, Voorberg J (2002). Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem cell Biol* 117:113-22.
- 388) van Sijl AM, Peters MJ, Knol DK, et al (2011). Carotid intima media thickness in rheumatoid arthritis as compared to control subjects: a meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum* 40(5): 389-97.
- 389) Vasanthi P, Ganesan N, Hariprasad C, Rajasekhar G, Meera S (2004). Plasma lipophilic antioxidant and pro-oxidant levels in rheumatoid arthritis. *J Indian Rheumatol Assoc* 12:40–2.
- 390) Vasudevan KM, Garraway LA (2010). AKT signaling in physiology and disease *Curr Top Microbiol Immunol* 347:105-33.
- 391) Vipartene D, Iasiulevichute L, Butkene B, Valiukene K, Keturkene A, Redaĩtene E (2006). Pro- and antioxidant blood system in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ter Arkh.* 78(6):10-4.
- 392) Vischer UM (2006). von Willebrand factor, endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 4(6):1186–1193.
- 393) Vischer UM, Jornot L, Wollheim CB, Theler JM (1995). Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood* 85(11) :3164–3172.
- 394) Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al (1990). Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81: 491-7.

- 395) Vitale C, Cerquetani E, Wajngarten M, Leonardo F, Silvestri A, et al. (2003) Inpatients with coronary artery disease endothelial function is associated with plasma levels of C-reactive protein and is improved by optimal medical therapy. *Ital Heart J* 4: 627–632.
- 396) Vuille C, Weyman A. Left Ventricle I (1994). General Considerations, Assessment of Chamber Size and Function. In *Principles and Practice of Echocardiography* Weyman E.A. Ed. 575-625. The Lea & Fabiger, Malvern.
- 397) Vuilleumier N., Bratt J, Alizadeh R, Jogestrand T, Hafström I, Frostegård J (2010). Anti-apoA-1 IgG and oxidized LDL are raised in rheumatoid arthritis (RA): potential associations with cardiovascular disease and RA disease activity. *Scand J Rheumatol* 39(6): 447–453.
- 398) Wagner JG, Roth RA (2000). Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 52: 349-74.
- 399) Wallberg-Jonsson S, Ohman M, Rantapaa-Dahlqvist S (2004). Which factors are related to the presence of atherosclerosis in rheumatoid arthritis? *Scand J Rheumatol* 33:373–379.
- 400) Watson DJ, Rhodes T, Guess HA (2003). All-causes mortality and vascular events among patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, or no arthritis in the General Practice Research Database. *J Rheumatol* 30: 1196-1202.
- 401) Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, et al (1993). Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil response to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7158-62.
- 402) Wennberg P, Wensley F, Di Angelantonio E, Johansson L, Boman K, Rumley A, Lowe G, Hallmans G, Danesh J, Jansson JH (2012). Haemostatic and inflammatory markers are independently associated with myocardial infarction in men and women *Thromb Res* 129(1):68-73.
- 403) Whincup PH, Danesh J, Walker M, Lennon L, Thomson A, et al (2002). von Willebrand factor and coronary heart disease. *Eur Heart J* 23:1764-711.
- 404) Wink DA, Mitchell JB (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25(4-5):434-56.



- 405) White D, Faye S, Doube A (2006). Atherogenic lipid profiles in rheumatoid arthritis. *N Z Med J* 119(1240): U2125.
- 406) Wolfe F, Freundlich B, Straus WL (2003). Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30: 36-40.
- 407) Wolfe F, Michaud K, Gefeller O, Cho HK (2003). Predicting mortality in patients with rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 48(6): 1530-42.
- 408) Wolfe F, Michaud K (2004). Heart failure in rheumatoid arthritis: rates, predictors, and the effect of anti-tumor necrosis factor therapy *Am J Med* 116(5):305-11.
- 409) Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, et al (1994). The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 481-494.
- 410) Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA (2002). Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 39:191-207.
- 411) Xu W, Charles IG, Moncada S (2005). Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial
- 412) Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME (1993). Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 73(1):205-9.
- 413) Zeiher AM, Fissithaler B, Schray-Utz B, et al (1995). Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 76: 1708-14.
- 414) Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33(3):337-49.
- 415) Zhang J (2002). MnSOD alters gene expression associated with apoptosis. *Virology* 76:355-363.
- 416) Zou M, Jendral M, Ullrich V (1999). Prostaglandin endoperoxide-dependent vasospasm in bovine coronary arteries after nitration of prostacyclin synthase. *Br J Pharmacol* 126(6):1283-92..

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ, МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

**КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИОНА ИНФОРМАТИКА**

Редни број	
Идентификациони број-ИБР	
Тип документације-ТД	Монографска публикација
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада – ВР	Докторска дисертација
Аутор – АУ	Др Мирјана Веселиновић
Ментор – МР	Проф др Драган Ђурић
Наслов рада	Процена функције ендотела и васкуларног ремоделовања код пацијената са реуматоидним артритисом
Језик публикације – ЈП	Српски (ћирилица)
Језик извода – ЈИ	Српски / Енглески
Земља публикавања – ЗП	Србија
Уже географско подручје – УГП	Шумадија
Година – ГО	2012.
Издавач – ИЗ	Ауторски репринт
Место и адреса	34000 Крагујевац Змај Јовина 53/1-7

---

---

Физички опис рада	231/40/16/416
Научна област – НО	Медицина
Научна дисертација – НД	Интерна медицина
Предметне одреднице/кључне речи-ПО	реуматоидни артритис, васкуларно ремоделовање, ендотелна функција
УДК	
Чува се – ЧУ	у Библиотеци факултета Универзитета у Крагујевцу

У студији која се бавила истраживањем васкуларног ремоделовања и ендотелне функције код пацијената са реуматоидним артритисом укључено је 52 пацијента са реуматоидним артритисом и контролна група од 20 здравих испитаника.

Свим испитаницима је урађено ултразвучно мерење дебљине зида каротидне артерије као и ултразвучно мерење ендотел –зависне вазодилатације брахијалне артерије. Као маркер субклиничке атеросклерозе, дебљина зида каротидне артерије и ендотел-зависна вазодилатација брахијалне артерије као маркер ендотелне дисфункције показују да је у реуматоидном артритису повећан ризик за кардиоваскуларна обољевања.

У истраживању је испитивана и улога фон Вилебрандовог фактора, параметара оксидативног стреса и запаљења, као и индекс активности

---

---

болести као фактора ризика за развој атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом.

Резултати ове студије указују на потребу за дијагностиком и мониториногом ране атеросклерозе код пацијената са реуматоидним артритисом.

Датум прихватања теме  
Од Стране НН већа

01.12.2010.

Чланови комисије – КО

Проф др Владимир Јаковљевић, председник  
Медицински факултет у Крагујевцу

Доц др Небојша Тасић, члан  
Медицински факултет у Београду

Проф др Милан Петронијевић, члан  
ВМА у Београду

---

---

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC, FACULTY OF MEDICINE

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Serial number	
Indetification number – INO	
Documentation type – DT	Monographic publication
Type of records – TR	Textual material, printed
Contens code – CC	Ph.D. Thesis
Author – AU	Dr. Mirjana Veselinovic
Mentor – MN	Ph. D Dragan Djuric
Title	Assessment of endothelial function and vascular remodeling in patients with rheumatoid arthritis
Language of text – LT	Serbian (Cyrilic)
Language of abstract – LA	Serbian / English
Country of publication – CP	Serbia
Locality of publication – UGP	Sumadija municipality
Publication Year – PY	2012.
Publication place – PP	34000 Kragujevac Zmaj Jovina 53/I-7
Physical description – PD	
Scientific field – SF	Medicine
Scientific discipline – SD	Internal Medicine
Subject / Key words – SKW	rheumatoid arthritis, vascular remodeling, endothelial function
UDC	
Holding data – HD	Library of Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Serbia
Note – N	

---

---

**Abstract – A**

In a study that dealt with the study of vascular remodeling and endothelial function in patients with rheumatoid arthritis included 52 patients with rheumatoid arthritis and a control group of 20 healthy subjects.

In all groups was done by ultrasound measurement of carotid artery wall and the ultrasound measurement endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. As a marker of subclinical atherosclerosis, carotid artery wall thickness and endothelium-dependent vasodilation of brachial artery as a marker of endothelial dysfunction showed that in rheumatoid arthritis at increased risk for cardiovascular disease.

The study examined the role of von Willebrand factors, oxidative stress and inflammation, as well as the index of activity of disease as risk factors for atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis.

The results of this study suggest the need for diagnosis and monitoring early atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis

Accepted by the Scientific

Board on

01.12.2010.

Thesis defend board members

Ph D Vladimir Jakovljević, the Chairman,  
Medical Faculty on Kragujevac

Doc D Nebojša Tasić, the Member  
Medical Faculty in Belgrade

Ph D Milan Petronijević, the Member,  
Military Academy in Belgrade

---

---

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Име и презиме	Мирјана Веселиновић (рођена Савић)
Датум и место рођења	26.02.1974, Крагујевац, Србија
Садашње запослење	Интерниста-реуматолог, Клинички Центар Крагујевац, Крагујевац Асистент-сарадник у настави, Медицински факултет, Крагујевац
Тел/фах	+38134370073
Електронска пошта	<a href="mailto:veselinovic.m@sbb.rs">veselinovic.m@sbb.rs</a>
Основне студије	1998, Медицински факултет, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација	Процена функције ендотела и васкуларног ремоделовања код пацијената са реуматоидним артритисом
Ментор	Проф др Драган Ђурић
Познавање страних језика	Енглески Немачки

---

---

## Списак објављених радова

- Веселиновић М, Јаковљевић В, Живковић В, Тончев с, Тасић Н, Богдановић В и Ђурић Д. Carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated vasodilatation in patients with rheumatoid arthritis. *Vasa – European Journal of Vascular Medicine* 2012; 41(5):343-51.
- Томић-Лучић С, Јовановић С, Петронијевић М, Веселиновић М. Перфорација колона као ретка манифестација Morbus Behcet. Војносанитетски преглед 2011;68(11):992-5.
- Савић М, Кучевић И, Ранковић А, Радисављевић М, Азањац А, Јаковљевић В. Оксидативни стрес у реуамтоидном артритису: резултати клиничке студије. *Medicus* 2005;6(2): 57-61.
- Јаковљевић В, Савић М, Кучевић И, Ранковић А, Радисављевић М, Азањац А, Ђурић Д. The effects of Dipyridamol on coronary flow, nitrite outflow and oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart. *Medicus* 2005: 6(2):57-61.
- Николић А, Петровић Д, Тирменштајн-Јанковић Б, Живановић М, Веселиновић М, Стојмировић Б. Дијагностика и лечење лупус нефритиса Тимоч Мед Глас 2011; 36(1): 48-55.,
- Николић А, Петровић М, Ђурђевић П, Веселиновић М, Петровић Д. Пулмо-ренални синдром: етиопатогенеза, дијагностика и лечење. *Медицински Часопис* 2011; 45(2): 36-41.
- Програм праћења болесница са остеопорозом које примају интравенски Ибандронат-Студија ИВОНА Н. Пилиповић, Б. Ковачевић-Завишић, А. Караџов-Николић, М. Басарић, Б. Стаменковић, М. Веселиновић, С. Божилов, Ј. Васић М, О. Илић-Стојановић, М. Ђуровић. Зборник радова-Годишњи Конгрес реуматолога Србије са међународним учешћем 2011. 117:118.
- Late-onset Systemic Lupus Erythematosus: Clinical features, course and prognosis. А. Томић-Лучић, Р. Петровић, М. Радак-Пертровић, Д. Миловановић, М. Веселиновић, С. Живановић, М. Петровић. *EULAR* 2012; 12-3162



---

---

**Author's Curriculum vitae**

**Name** Mirjana Veselinović (born Savić)

**Born** 26.02.1974, Kragujevac, Srbija

**Position** Internist-rheumatologist, Clinical Center  
Kragujevac, Kragujevac

**Fone/fax** +38134370073

**E-mail** [veselinovic.m@sbb.rs](mailto:veselinovic.m@sbb.rs)

**M.D.** 1998, Faculty of Medical Sciences  
Kragujevac, University of Kragujevac,  
Serbia

**PhD Thesis** Assessment of endothelial function and  
vascular remodeling in patients with  
rheumatoid arthritis

**Menthor** Ph D Dragan Đurić

**Language proficinecy** English  
German

**List of publications**

- 
- 
- Veselinović M, Jakovljević V, Živković V, Toncev S, Tasic N, Bogdanovic V, Djuric D. Carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated vasodilatation in patients with rheumatoid arthritis. *Vasa – European Journal of Vascular Medicine* 2012; 41(5):343-51.
  - Tomić-Lučić A, Jovanović S, Petronijević M, Veselinović M. Colonic perforation as an unusual manifestation of Behcet's disease. *Vojnosanit Pregl* 2011;68(11):992-5.
  - Savić M, Kučević I, Ranković A, Radisavljević M, Azanjac A, Jakovljević V. Oxidative stress in Rheumatoid arthritis: results of a clinical study. *Medicus* 2005; 6(2): 80-81
  - Jakovljević V, Savić M, Kučević I, Djurić A, Ranković A, Radisavljević M, Azanjac A, Djurić D. The effects of Dipiridamol on coronary flow, nitrite outflow and oxidative stress during coronary autoregulation in isolated rat heart. *Medicus* 2005; 6(2):57-61.
  - Nikolić A, Petrović D, Tirmenštajn-Janković B, Živanović M, Veselinović M, Stojmirović B. Diagnostics and therapy of lupus nephritis. *Timoč Med Glas* 2011; 36(1): 48-55.,
  - Nikolić A, Petrović M, Đurđević P, Veselinović M, Petrović D Pulmonary-renal syndrome: ethiopathogenesis, diagnosis and treatment.. *Medicinski Časopis* 2011; 45(2): 36-41.
  - Program monitoring of patients with osteoporosis who are receiving intravenous Ibandronat - Study IVONA. N. Pilipović, B. Kovačević-Zavišić, A. Karadžov-Nikolić, M. Basarić, B. Stamenković, M. Veselinović, S. Božilov, J. Vasić . O. Ilić-Stojanović, M. Đurović. *Proceedings-Annual Congress of Rheumatology of Serbia with international participation.* 2011. 117:118.
  - Late-onset Systemic Lupus Erythematosus: Clinical features, course and prognosis. A. Tomic Lucic, R. Petrovic , M. Radak Perovic , D. Milovanovic , M. Veselinovic , S. Zivanovic , M. Petrovic. *EULAR* 2012; 12-3162