



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Нела (К) Живковић

**ПАТОФИЗИОЛОШКИ АСПЕКТИ
ПОРЕМЕЋАЈА МЕТАБОЛИЗМА ПУРИНА У
РЕУМАТОИДНОМ АРТРИТИСУ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ниш, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Nela (K) Živković

**PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF
PURINE METHABOLISM DISORDER IN
RHEUMATOID ARTHRITIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

Универзитет у Нишу, Медицински факултет
Проф. др Борис Ђинђић

Наслов:

Патофизиолошки аспекти поремећаја метаболизма пурина у реуматоидном артритису

Резиме:

Циљ рада је испитивање активности ензима пуриног метаболизма код болесника са реуматоидним артритисом, као и испитивање повезаности тежине клиничког испољавања реуматоидног артритиса и степена инфламације са активношћу ензима који учествују у метаболизму пурина. Испитивањем је обухваћено 160 болесника са дијагнозом реуматоидног артритиса (RA) од којих је 100 са касним и 60 са раним RA, као и 60 контролних болесника. Активност 5'-нуклеотидазе испољава значајну повезаност са касним RA док је пораст ADA активности повезан са раним RA. Активност болести у касном RA показује слабу али значајну негативну повезаност са вредностима AMP дезаминазе. У раном RA постоји врло јака и значајна инверзна корелација вредности RF и активности AMP дезаминазе ($C=-0.89$, $p<0.05$). Није забележена повезаност брзине седиментације, концентрације фибриногена и броја леукоцита са фазом RA. DAS28 скором показује повезаност са свим маркерима инфламације код болесника са касним RA. VAS бола показује значајну повезаност са CRP-ом, док индекс HAQ показује повезаност са CRP и RF. Код болесника са раним RA брзина седиментације и вредности CRP су показали повезаност са DAS28 скором. Бинарном регресионом анализом приказано је постојање значајне везе између активности ADA и појаве RA, као и постојање значајне везе између брзине седиментације и појаве RA. Активност ADA је значајно већа код болесника који нису лечени метотрексатом у односу на болеснике који су лечени метотрексатом. Забележена је већа активност ксантин оксидазе код болесника који нису лечени метотрексатом. Закључили смо да код болесника са реуматоидним артритисом постоје значајне промене у активности ензима укључених у метаболизам пурина што указује на њихову значајну патогенетску улогу у настанку и развоју реуматоидног артритиса. Поремећај метаболизма пурина и инфламација представљају независне факторе који имају значајну улогу у патогенези и клиничком испољавању реуматоидног артритиса. Метотрексат испољава повољан терапијски ефекат посредством смањења броја гранулоцита, активности аденозин дезаминазе и ксантин оксидазе у реуматоидном артритису.

Научна област: Научна дисциплина:	Медицина
	Реуматологија; Патофизиологија
Кључне речи:	Реуматоидни артритис, метаболички поремећаји, метаболизам пурина, ензими, патофизиолошки аспект
УДК:	616.72-002.77:616-008.831-092(043.3)
CERIF класификација:	B580 Скелет, мишићи, реуматологија, локомоција
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	University of Nis, Faculty of Medicine PhD Boris Djindjic
Title:	Pathophysiological Aspects of Purine Metabolism Disorder in Rheumatoid Arthritis
Abstract:	The aim of the paper is testing the activity of purine metabolism enzyme at patients with rheumatoid arthritis, as well as testing the connection between the severity of clinical manifestation of rheumatoid arthritis and inflammation degree, and the activity of the enzyme which takes part in purine metabolism. The research included 160 patients diagnosed with rheumatoid arthritis (RA), 100 of which had late and 60 early RA, as well as 60 control group patients. Activity of 5'-nucleotidase showed significant connection with late RA. Disease activity in late RA showed mild, but significant negative correlation with AMP deaminase. Early rheumatoid arthritis showed strong and significant inverse correlation between RF values and activities of AMP deaminase ($C=-0.89$, $p<0.05$). There was no correlation between sedimentation rate, fibrinogen concentration and number of leucocytes, and RA stage. DAS28 score demonstrated connection with all inflammation markers at patients with late RA. VAS scale of pain showed significant correlation with CRP, while HAQ score showed correlation with CRP and RF. As for patients with early RA, sedimentation rate and CRP values correlated with DAS28 score. Binary regression analysis proved the presence of significant correlation between ADA activity and RA occurrence, as well as between sedimentation rate and RA occurrence. ADA activity was significantly higher at patients who were not treated with methotrexate, as compared to patients who were treated with methotrexate. We recorded increased activity of xanthine oxidase at patients who were not treated with methotrexate and thus concluded that patients with rheumatoid arthritis had significant changes in the activity of enzymes included in purine metabolism, which pointed to their important role in the occurrence and development of rheumatoid arthritis. Purine metabolism disorder and inflammation represent independent factors which have a significant role in pathogenesis and clinical manifestation of rheumatoid arthritis. Methotrexate has a favorable therapeutic effect as it reduces the number of granulocytes, activities of adenosine deaminase and xanthine oxidase at rheumatoid arthritis.

Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Rheumatology; Pathophysiology
Key Words:	Rheumatoid arthritis, metabolic disorders, purine metabolism, enzymes, pathophysiological aspect
UDC:	616.72-002.77:616-008.831-092(043.3)
CERIF Classification:	B580 Skeleton, muscle system, rheumatology, locomotion
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

За израду ове докторске дисертације посебну захвалност дугујем:

Ментору, **Проф. др Борису Ђинђићу**, на несебичној, стручној и методолошкој подршци, указаном поверењу и времену које ми је посветио током израде докторске дисертације.

Проф. др Гордани Коцић, на драгоценим саветима, примедбама и сугестијама у свим етапама израде овог истраживања. Посебно јој се захваљујем за несебично пренето знање из области биохемије, као и на разумевању које је имала за кандидата када је то било потребно.

Проф. др Владмили Бојанић, за корисне савете и подршку током израде докторске дисертације.

Доц. др Соњи Стојановић за искрену, пријатељску и стручну помоћ и подршку током заједничког рада, као и на помоћи у реализацији ове докторске дисертације.

Проф. др Снежани Живанчевић Симоновић на разумевању и указаном поверењу током израде финалне верзије рада.

Искрену захвалност упућујем колективу Клинике за реуматологију Института "Нишка Бања", без чије помоћи реализација овог доктората не би била могућа.

Целом колективу Института за биохемију Медицинског факултета у Нишу за помоћ у реализацији методологије истраживања, посебно Светлани Стојановић за несебичну помоћ у лабораторијском испитивању.

Највећу захвалност дугујем мојој породици чија ми љубав и стрпљење дају снагу и веру да истрајем на путу остварења правих циљева.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Дефиниција и епидемиологија реуматоидног артритиса.....	1
1.2. Етиологија реуматоидног артритиса.....	2
1.3. Имунопатогенеза реуматоидног артритиса.....	3
1.3.1. Цитокини	6
1.3.2. Продукција цитокина у инфламацији	7
1.3.3. Инфламаторни процес у реуматоидном артритису	9
1.4. Клиничка слика реуматоидног артритиса	10
1.5. Радиолошка презентација реуматоидног артритиса.....	13
1.6. Функцијска способност оболелих од реуматоидног артритиса	15
1.7. Терапијски приступ у лечењу болесника са реуматоидним артритисом	17
1.8. Метаболизам пурина	21
1.8.1. Структура и значај 5'-нуклеотидазе	24
1.8.2. Структурне и каталитичке особине аденозин монофосфат дезаминазе.....	26
1.8.3. Структура и значај аденозин дезаминазе	29
1.8.4. Ксантин оксидаза у метаболизму пурина.....	32
1.9. Значај ензима пуриног циклуса у инфламаторном процесу реуматоидног артритиса	34
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	37
3. РАДНА ХИПОТЕЗА.....	38
4. БОЛЕСНИЦИ И МЕТОДОЛОГИЈА РАДА	39
4.1. Испитаници	39
4.2. Методологија.....	40
5. РЕЗУЛТАТИ.....	45
5.1. Опште карактеристике испитиваних група.....	45
5.2. Клиничке карактеристике болести.....	48
5.3. Лабораторијски параметри испитиваних група болесника	56
5.4. Активност ензима укључених у метаболизам пурина	58
5.5. Тежина клиничког испољавања реуматоидног артритиса и активност ензима пуриног циклуса.....	59
5.6. Повезаност степена инфламације са ензимима укљученим у метаболизам пурина	61
5.7. Повезаност маркера инфламације и тежине клиничке слике	64
5.8. Повезаност инфламације и поремећаја метаболизма пурина са појавом реуматоидног артритиса	68

5.9. Карактеристике ензима пуриног циклуса и маркера инфламације код примене Метотрексата	69
6. ДИСКУСИЈА.....	71
6.1. Ензими метаболизма пурина у реуматоидном артритису	73
6.1.1. Активност 5'-нуклеотидазе у реуматоидном артритису	73
6.1.2. Активност аденозин монофосфат дезаминазе у реуматоидном артритису	74
6.1.3. Активност аденозин дезаминазе у реуматоидном артритису.....	74
6.1.4. Активност ксантин оксидазе у реуматоидном артритису.....	75
6.2. Тежина клиничког испољавања реуматоидног артритиса и метаболизам пурина	76
6.2.1. Однос ензима пуриног циклуса и активности болести код болесника са реуматоидним артритисом	76
6.2.2. Однос ензима пуриног циклуса и функцијске способности болесника са реуматоидним артритисом	78
6.3. Повезаност степена инфламације са активношћу ензима метаболизма пурина у реуматоидном артритису.....	80
6.4. Повезаност инфламације и клиничких манифестација реуматоидног артритиса	85
6.5. Значај Метотрексата у контроли активности ензима метаболизма пурина у серуму болесника са реуматоидним артритисом.....	91
7. ЗАКЉУЧЦИ	94
8. ЛИТЕРАТУРА.....	95
Прилог 1	110
Прилог 2.....	113

1. Увод

1.1. Дефиниција и епидемиологија реуматоидног артритиса

Реуматоидни артритис (РА) је идиопатско, инфламаторно, хронично обољење, које карактерише симетрични полиартритис диартротичних зглобова у чијој основи је прогресивни, перзистентни и деструктивни синовитис аутоимунске природе (1). Временом долази до ирверзибилног анатомског оштећења зглобова, деформација и анкилозе са последичним инвалидитетом.

Први наговештаји издвајања реуматоидног артритиса у посебни патолошки ентитет се јављају у медицинској литератури у 18-ом веку. Термин реуматоидни артритис први је употребио Garod у стручној литератури 1859. године. Касније се од РА издвајају остеоартритис (1922.) и спондилоартропатије (1956.) (2). Ваалер је 1940. открио IgM реуматоидни фактор (RF), први имунолошки маркер обољења, који издваја РА од других облика артритиса (3) и на тај начин покренуо вишедеценијску борбу научника у разоткривању узрочника ове болести, начина манифестовања и терапијског приступа оболелима.

РА је најчешћа запаљенска реуматска болест са преваленцијом од 0,5% код европских народа и 6% код индијанских племена Северне Америке, са најчешћом појавом болести између 30. и 50. година живота (4). Жене чешће оболевају, у односу 3:1, при чему се тај однос између мушкараца и жена одржава у свим деценијама живота (после 20. године) са нешто учесталијом појавом болести код жена после 50. године живота (5). Разлика у половима је мање изражена код болесника са позитивним RF после 50. године живота. Инциденца је 0,5 на 1000 жена и 0,2 на 1000 мушкараца и равномерна је у односу на географску распрострањеност осим међу Кинезима где је нижа, 0,3 и Индијанцима у северној Америци, око 5 (6).

Код ових болесника повећана је смртност просечно 1,3 пута код мушкараца и 1,4 пута код оболелих жена, а животни век је скраћен за 3 до 7 година у односу на здраве људе (7).

1.2. Етиологија реуматоидног артритиса

Реуматоидни артритис је болест непознате етиологије, али досадашња сазнања указују да је он резултат истовременог утицаја генетских, хормонских, имунолошких фактора и фактора спољашње средине.

Генетско учешће у етиологији ове болести базирано је на постојању гена HLA и представља један од најважнијих унутрашњих чинилаца.

Типизација молекула HLA класе II је показала да су 60-70% болесника са RA HLA-DR4 позитивни у поређењу са 20-25% у контролној групи, што повећава ризик за појаву болест 4 до 5 пута (8). Већа склоност за појаву RA у вези је са постојањем "заједничких епитопа" у трећем хиперваријабилном региону DR бета ланца (9). То су аминокиселинске секвенце QKRAA или QRRAA које постоје у Dw4 и Dw14 подтипovima DR4. Ове аминокиселине учествују у формирању зидова жлеба за који се везује Ag и формира колмплекс пептид-HLA молекула. Са појавом RA највише су повезане специфичне секвенце бета ланца DR и то: DRB*0401, DRB*0404, DRB*0101 и DRB*1402 (10). Ови локуси се могу наћи код 96% оболелих од RA. Значај ових молекула HLA класе II је учешће у презентацији непознатог антигена Т ћелијама, чиме започиње сложени патогенетски механизам имунске инфламације у RA (3). Поред HLA гена који су од значаја за RA последњих година је показано да учешће у развоју ове болести узимају и други гени као што су цитокински, имуноглобулински и гени TCR (11).

Ендокрини фактори, као део могућих етиолошких фактора у настанку RA, налазе своју потврду у већој учесталости RA код особа женског пола, посебно у њиховом фертилном периоду, чешћој појави код старијих мушкараца и смањивању односа женског према мушком полу 1,4: 1 (12). Такође је показано да је могућ утицај стреса и начина исхране на етиологију ове болести.

Спољашњи фактори се односе на инфективне агенсе као могуће покретаче имунолошке реакције. То су најчешће Epstein-Barr virus (EBV), retrovirusi, Proteus mirabilis, Mycobacterium tuberculosis, неки сојеви E. coli, Mycobacterium и Klebsiella. Инфективни агенс може потенцијално да услови настанак и хронично одржавање инфламације у RA механизмима различитим од директно инфективних и ткивно деструктивних. Ови механизми могу укључивати ћелијску промену изазвану вирусом или индукцију аутоимунитета механизмима "антигенске мимикрије" (12). Антигенска мимикрија подразумева имунски одговор на спољашњи антиген који је врло сличан аутоантигену. При индукцији оваквог имунског одговора долази до укрштене реакције антитела са аутоантигеном. Уколико одговор

исувише дуго траје, аутоантиген може одржавати имунски одговор и када је спољашњи антиген одстрањен (10). За сада нема доказа да пиогене бактерије или микробактерије узрокују RA, мада артритис код животиња изазван антигеном из зида стрептококне ћелије или убијеном микробактеријом има клиничке и хистолошке одлике RA (13). Хламидије и микоплазме у експерименталним условима могу узроковати имунски одговор сличан одговору у RA, али за сада још увек нису идентификовани њихови геноми у ткиву зглобова. Протеин dnaJ *Escherichiae coli* који садрже QKRAA је HSP бактеријске природе, па ћелије Т синовијске течности изразито пролиферишу у присуству овог протеина (14). Код RA болесника су доказане повећане концентрације антитела на EBV, наиме потврђена је сличност капсидног антигена EBV и делова HLA-DRB1 епитопа који је одговоран за развој RA (15).

Етиологија RA је недовољно позната, али се може рећи да је њен настанак условљен истовременим дејством генетских фактора ризика, спољашњих чиниоца и променама у имунском систему организма.

1.3. Имунопатогенеза реуматоидног артритиса

Последњих десетак година приказана су обимна саопштења нових сазнања у вези са имунопатогенезом RA. Захваљујући достигнућима ћелијске и молекуларне биологије, детаљније су проучени механизми укључени у презентацију антигена, структура Т ћелијског рецептора, молекуларна збивања у току леукоцитне атхезије за ендотелне ћелије синовије и функционисање мреже цитокина (16).

Досадашња истраживања су показала да је RA имуноинфламаторно обољење са комплексном патогенезом и учешћем различитих типова ћелија. Актуелна су два концепта патогенезе RA: класичан и фундаментални.

По *класичном концепту* претпоставља се да почетак и одржавање имуноинфламацијског процеса зависе од Т ћелијског одговора на непознати антиген, чиме се покреће читав низ даљих догађаја. Према овом схватању артритогени антиген бива фагоцитован од антиген презентујуће ћелије, разграђен у пептиде, везан у антиген-везујућем жлебу HLA класе II молекула и тако обрађен буде презентован CD4⁺ Т ћелијама. CD4⁺ ћелије стимулишу: моноците, макрофаге и синовијске фибробласте (SF) на продукцију IL-1 γ , IL-6 и TNF α што води ка инфламацији, али стимулишу и Б ћелије на продукцију реуматоидног фактора, експресију остеопротегерина и на тај начин стимулацију остеокластогенезе (12). Настала инфламација доводи до дисбаланса медијатора и оштећења ткива.

Фундаментални концепт патогенезе RA истиче значај Б ћелија у отпочињању аутоимуног процеса. Стимулисане Б ћелије секретују IgG, IgM и IgA реуматоидни фактор, који у синовији и синовијској течности формирају имунске комплексе уз активацију система комплемента и ослобађања протеаза, леукотријена и других проинфламаторних агенаса, и натај начин до деструктивних промена у зглобу. Б ћелије, такође, учествују у активацији Т-ћелија, селекцији цитокина и продукцији аутоантитела.

Познато је да се имунопатолошки процес у синовији одвија у пет фаза:

I фаза- препознавање и презентација непознатог антигена Т- ћелијама

II фаза- пролиферација аутореактивних клонова Т и Б лимфоцита, миграција инфламацијских ћелија у зглоб и ангиогенеза

III фаза- пролиферација синовијалних ћелија, презентација цитокина

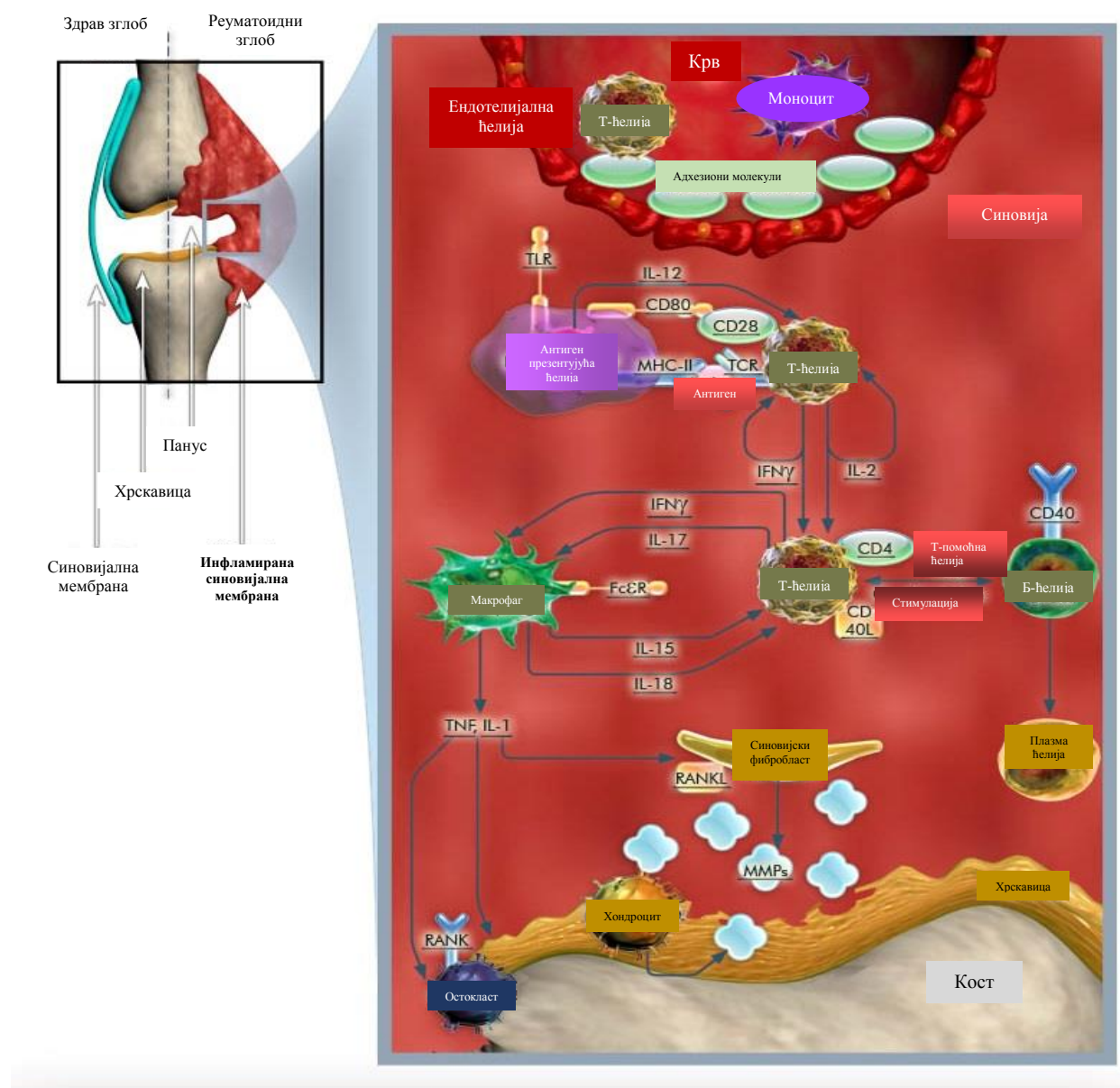
IV фаза- формирање пануса, активирање хондроцита и металопротеиназа, почетна деструкција зглоба

V фаза- деструкција зглобне хрскавице, кости и околних структура .

Главни таргет орган у RA је синовијска течност и синовијска мембрана. Волумен синовијске течности се повећава, повећава се целуларност при чему преобладају полиморфонуклеари, који се обично ретко срећу на мембрани синовије. Друга значајна популација ћелија на синовијској мембрани су Т-лимфоцити, макрофаги, дендритичне ћелије и Б-лимфоцити. Промене на синовијској мембрани су посебно значајне (17).

Основни ћелијски лајер, који нормално садржи два слоја ћелија, постаје знатно тањи, са повећаним бројем ћелија типа А (макрофагима сличне ћелије) и типа Б (фибробластима сличне ћелије). Оба ћелијска типа у повећаном броју експримирају активационе маркере (15). Дубљи слојеви синовије повећавају своју целуларност са појавом периваскуларних акумулација и фоликула. Ови инфилтрати су богати CD4⁺ Т-лимфоцитима и макрофагима, који се могу наћи и између периваскуларних инфилтрата. Срећу се и полиморфонуклеарне и дендритичне ћелије, али знатно мање у односу на синовијску течност.

Синовијска мембрана постаје изузетно васкуларизирана са појавом венула са високим ендотелом које се срећу у лимфним чворовима. Већина ћелија синовијске мембране је активирана, те се експресија МНС II класе може доказати на скоро свим ћелијским типовима. Посебно је повећана експресија HLA-DQ што је карактеристично за RA у односу на друге типове артритиса. На макрофагима се може доказати повећана експресија CD11c (p150/95), CD11a (LFA-1) као и неке врсте VLA молекула. Ендотелне ћелије имају повећану експресију ICAM-1, VLA-1 и ELAM-1 адхезионих молекула. Рецептори из групе TNF рецептора су присутни на скоро 80% ћелија синовијске мембране (18).



Слика 1. Патогенеза реуматоидног артритиса- адаптирана слика преузета са <http://www.ebioscience.com> CC licence

Место на коме се спајају синовијска мембрана, хрскавица и кост је тачка у којој започињу рани ерозивни процеси. Долази до значајне пролиферације крвних судова, задебљања синовије и формирања пануса. Панус, новонастало ткиво, деградира околну хрскавицу, разарајући њен матрикс и хондроците, деловањем ензима металопротеиназа. На сличан начин матрикс разара и околне коштане елементе уз то активирајући остеокласте (19).

Имунопатогенеза RA започиње измењеном функцијом ендотелних ћелија, које показују значајно већу експресију адхезионих молекула, што омогућава нагомилавање

имунокомпетентних ћелија у синовијској мембрани. Овај процес је вероватно покренут повећаним нивоима IL-1, TNF и IFN- γ (фаза иницијалне инфламације). Подједнако важан утицај има и повећана продукција хемотактичких фактора, попут IL-8, RANTES (Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted) који делују на накупљање макрофага, неутрофила и CD4⁺CD45RO Т-лимфоцита, а доказани су у синовијској течности (20).

Прихваћено је да су почетак и хронични ток RA зависни од Т ћелијског одговора на непознати антиген. Већину Т-лимфоцита чине CD4⁺ Т лимфоцити који су у великом проценту $\gamma\delta$ -типа TCR (T-Cell Receptor). Ово се доводи у везу са њиховом реактивношћу на хит шок протеине (hsp) различите врсте који се сматрају пропагаторним антигенима инфламаторног одговора. Повећана присутност TCR са специфичним V β ланцем указује на могућност деловања неког суперантигена као покретача аутоимуног процеса (21). RA је сврстан у групу Th1 посредованих болести, захваљујући заступљености Т ћелијских популација и цитокинском профилу у синовијској течности. Показано је да централне ћелије које одређују Th1/Th2 баланс представљају моноцити инфламиране синовије. Моноцити, макрофаги, дендритичне ћелије, CD5⁺ Б лимфоцити и хондроцити представљају главне антиген-презентујуће ћелије, од којих моноцити и макрофаги чине 30-50% ћелијског састава инфламиране синовије (22).

Иако је несумњив значај Т лимфоцита у патогенези RA, у последње време се све више важности придаје Б лимфоциту који, као веома ефикасна антиген презентујућа ћелија, може значајно допринети развоју ове болести. Синовијална течност зглобова, који су захваћени RA, садржи мноштво Б лимфоцита. Б лимфоцити имају 3 кључне улоге у патогенези RA: а) антиген презентација која доводи до активације Т-лимфоцита, б) стварање аутоантитела, ц) лучење цитокина.

1.3.1. Цитокини

Цитокини представљају велику фамилију протеинских молекула који функционишу као медијатори и регулатори ћелијских комуникација и посредници су имунског одговора. Посредством специфичних рецепторских молекула, они преносе информације унутар и између ћелија, а често различити цитокини могу да имају сличне биолошке ефекте. Одлика да омогућавају локалну комуникацију истиче разлику између мреже цитокина и ендокриног система. Цитокини се само повремено налазе у циркулацији, када их производе ендотелне ћелије или када је њихова продукција у ткивима велика (16, 23).

Цитокини делују на два начина: 1. ако се ослободе из ћелија у солубилном облику ступају у интеракцију са суседним ћелијама (паракрини ефекат) или делују на ћелије које их продукују (аутокрини ефекат); 2. уколико су изражени на ћелијској мембрани (TNF- α и IL-1 α) (јукстакрина сигнализација) учествују у директној међућелијској комуникацији.

Већина цитокина учествује у физиолошким процесима као што су развој и диференцијација ћелија, органогенеза, хематопоеза, опоравак и репарација ткива, регулација имунске реакције. Цитокини, посебно TNF-алфа, IL-1 и IL-6 првенствено имају улогу у урођеном имунском одговору, али и у стеченим имунским реакцијама што наглашава тесну повезаност ова два одбрамбена система (24). Проинфламаторни цитокини повећавају синтезу реактаната акутне фазе у јетри, а већина ових молекула учествује у природном имунском систему.

1.3.2. Продукција цитокина у инфламацији

Производњу цитокина регулишу различити стимуланси као што су други медијатори инфламације и међућелијски контакт. У инфламираном ткиву цитокини су у интеракцији међусобно али и са осталим растворљивим медијаторима. Њихова равнотежа је регулисана механизмом повратне спреге и супротним ефектима цитокина (25). Ћелије T CD4⁺ имају три фенотипа са посебним профилем цитокина:

- TH1 T ћелије производе IFN-гама, IL-2, и IL-12
- TH2 T ћелије луче IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13. Обе подгрупе ћелија луче цитокине TNF- α , IL-3 и GM-CSF. TH 0 лимфоцити продукују цитокине TH 1 и TH2 типа.
- TH3 T ћелије луче TGF-бета.

Фенотип T лимфоцита одређује функцију подгрупе, а однос TH1 и TH2 утиче на преовлађивање целуларне или химоралне имунске реакције.

Цитокини поред улоге у нормалном имунском одговору имају велики значај у иницирању и одржавању синовитиса. Постоје докази да су цитокини које стварају T лимфоцити смањени насупрот продуктима макрофага и синовиијских фибробласта који су у великим концентрацијама нађени у RA. Управо од равнотеже између проинфламаторних и антиинфламаторних медијатора, зависи одржавање инфламације и њен исход (26). Равнотежу у цитокинској мрежи регулише неколико механизма интеракције и повратне спреге.

Цитокини који су солубилни као и они који су везани за мембрану могу међусобно стимулирати производњу (позитивна повратна спрега) чиме се појачава инфламаторна

реакција. Насупрот томе, негативном повратном спрегом могу да индукују производњу цитокина са антагонистичким ефектима, смањујући на тај начин инфламацију. Мањи број цитокина може да делује стимулаторно и инхибиторно, те тако различито да утиче на запаљенску реакцију. Лекови који се користе у лечењу РА на одређени начин утичу на неравнотежу цитокина (27).

Интеракције цитокина:

1. Основни регулаторни механизам је равнотежа про и антиинфламаторних цитокина, про и антиангиогеничних цитокина. У РА постоји вишак проинфламаторних у односу на антиинфламаторне цитокине (супротни ефекти цитокина).
2. Неки цитокини, TGF-бета і IL-6, зависно од концентрације могу стимулисати или инхибисати инфламацију и ангиогенезу (двоструки ефекти цитокина).
3. Интеракције цитокина са осталим медијаторима: TNF-алфа стимулише друге проинфламаторне цитокине, IL-1 појачава производњу цитокина и хемокина, а оба стимулативно делују на секрецију протеолитичких ензима (MMPi активатор плазминогена) а који доводе до деградације матрице (позитивни повратни ефекти).
4. Проинфламаторнимедијатори стимулишу производњу својих антагониста и смањују инфламацију негативном повратном спрегом (негативни повратни ефекти).
5. IL-4, IL-10 и IL-13 смањују производњу проинфламаторних медијатора као што су TNF-алфа, IL-1 і MMP. Такође могу појачати производњу антагониста проинфламаторних цитокина (негативни и позитивни повратни ефекат).
6. Нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ), гликостероиди и лекови који модификују ток болести (ЛМТБ), смањују производњу проинфламаторних медијатора и на тај начин спречавају прогресију болести (28).

У реуматоидном артритису инфламаторни процес може постати аутономан што омогућава одржавање инфламације и после смањења активности ћелија Т. До запаљења доводе аутокрини и паракрини ефекти цитокинске мреже синовијских макрофага и фибробласта (26). Велики број цитокина који постоје у синовији и синовијској течности доприносе инфламаторном процесу, стимулишући хиперплазију ћелија интима, индукцију HLA-DR, адхезивних молекула и ангиогенезе. Најважнији цитокини овог процеса су IL-1 і TNF-алфа синовијских макрофага, који стимулишу пролиферацију синовијских фибробласта, секрецију IL-6, GM-CSF, хемокина и ефекторних молекула, MP і PGE. GM-CSF кога продукују синовијски макрофази и стимулисани фибробласти механизмом поватне спреге индикује секрецију IL-1. Заједно са TNF-алфа, GM-CSF повећава експресију HLA-DR на макрофазима. Цитокини синовицита индиректно доприносе локалној активацији Т и Б

лимфоцита, укључујући производњу RF. Уколико је синовитис заиста узрокован трансформисаним ћелијама, спољашњи стимулус, који отпочиње процес инфламације, мора периодично да се понавља (28). Локални инфламаторни одговор је посредован и појачан реакцијама ћелија Т које су усмерене било на иницијални антиген, за сада непознат или секундарне антигене као што су колаген типа II или протеоглигани. Тачна функција синовијских ћелија Т је за сада непозната и поред тога што су цитокински профил и улога синовицита добро дефинисани. Специфична стимулација антигеном и улога Т ћелија може бити променљива зависности од фазе болести. Специфична активација ћелија Т антигеном је најважнија у раном периоду RA, а како обољење напредује мрежа и утицај цитокина постају стални и утврђени. На тај начин се инфламација одржава реакцијама које више не зависе од антигена (16).

1.3.3. Инфламаторни процес у реуматоидном артритису

Опште прихваћен концепт инфламације и ћелијске деструкције у реуматоидном артритису подразумева комплексну интеракцију међу различитим ћелијским типовима уз постојање изражене генетске предиспозиције.

Хронични инфламаторни одговор и аутоимуност развили су се у биолошком одговору као заштитни и репаративни механизам у коме главну улогу играју имунокомпетентне ћелије. Хронична инфламација може имати два типа одговора. Један, који настаје непосредно након акутне инфламације и није у стању да потпуно одстрани антиген, те се инфламација одржава неколико месеци. Други тип одговора има хронични ток од самог почетка, што је одлика реуматских обољења и резултира стварањем гранулационог инфламаторног ткива са накупљањем мононуклеарних фагоцита и мултинуклеарних цитовских ћелија. Овакав тип ткива је и реуматоидни панус који се састоји од различитих врста ћелија. Одржавање инфламације омогућено је одржавањем сталног присуства неког страног ткива или антигеним деловањем неког ауто-антигена (29).

Локални инфламаторни одговор у RA може бити подељен у три фазе: васкуларна, ексудативна и пролиферативна након које следи фаза регенерације и ожиљавања. Поред локалне манифестације, инфламаторни процес је праћен системском реакцијом која се манифестује појавом температуре и повећаном секрецијом реактаната акутне фазе у серуму.

- 1) Васкуларна фаза инфламације започиње као последица оштећења ткива, што индукује ослобађање велике количине медијатора, попут хистамина, а то доводи до дилатације

венула и периферног васкуларног корита. Успоравање тока крви кроз васкуларно корито омогућава ексудацију плазме у периваскуларно ткиво. Фагоцити улазе у интерстицијум, пролазећи поред ендотелијалних ћелија. Повећана трансудација различитих састојака плазме, попут кинина, одржава се након фазе хиперемije ткива, док акумулација фибриногена омогућава активацију система коагулације. Различит антигени материјал који се накупља у ткиву бива убрзано транспортован лимфним путевима у лимфне органе што омогућава започињање реакција хроничног инфламаторног одговора.

- 2) Ексудативна фаза инфламације почиње акумулацијом леукоцита на месту инфламације и продукцијом великог броја различитих хемотактичких супстанци. Лизозомални хидролитички ензими и други проинфламаторни медијатори интензивно се ослобађају из локалних ткивних макрофага. Макрофаги, пореклом од циркулишућих моноцита, имају доминантну улогу у овој фази инфламаторног одговора индукујући акумулацију имунокомпетентних ћелија и омогућавајући процес антиген презентације (26)
- 3) Пролиферативну фазу инфламаторног одговора карактерише фибробластна и ангиобластна активност која започиње процес репарације. Фибробласти обично потичу из периваскуларног везивног ткива и бивају стимулирани локално акумулираним медијаторима да започну процес пролиферације који води ожиљавању. Истовремено, ангиобласти пореклом из ендотелијалних ћелија формирају нове капиларне канале, кроз тромбозирано инфламирано ткиво, што омогућава започињање процеса реваскуларизације ожиљног ткива.

1.4. Клиничка слика реуматоидног артритиса

Клиничку слику RA карактеришу бројни симптоми и знаци, како од стране зглобова, тако и од ванзглобних структура, а понекад и од стране унутрашњих органа. У основи реуматоидног артритиса су симетричан бол и оток периферних зглобова, дуготрајна јутарња укоченост, појава реуматоидног фактора у крви и карактеристичне радиолошке промене.

Прву класификацију болести, која помаже у дијагностификовању RA, дало је Америчко удружење реуматолога 1958. године (ревидирана 1987. године), чија је сензитивност 94%, а специфичност 89% (30).

Табела 1. Дијагностички критеријуми за реуматоидни артритис

КРИТЕРИЈУМИ	ДЕФИНИЦИЈА
1. јутарња укоченост	У трајању више од једног сата
2. артритис 3 или више зглобних подручја	Потврђен лекарским прегледом
3. артритис руку	На бар једном зглобном подручју руку
4. симетрични артритис	Истовремена захваћеност билатералних зглобних подручја
5. реуматоидни чворићи	Субкутани чворићи изнад коштаних узвишења, на екстензорним површинама или јукстаартикуларно
6. реуматоидни фактор	Присуство повећених концентрација реуматоидног фактора у серуму
7. радиолошке промене	Дифузна остеопороза јукстаартикуларног подручја МСР зглобова, сужење зглобних простора, узуре или ерозије уз руб костију, почетна Z-деформација палца

Критеријуми Америчког удружења реуматолога (ACR-American Collage of Rheumatology)

Болесник има RA ако је 4 од 7 критеријума присутно, при чему промене из критеријума 1-4 морају да трају најмање 6 недеља.

Ова класификација болести је доста коришћена, али показује недостатак када је реч о постављању ране дијагнозе RA. Наиме, клиничке манифестације RA могу се поделити на ране промене које су карактеристичне за тзв. "рани RA" и промене које се срећу у одмаклим фазама болести које се називају "прогресивним RA" или "касним RA".

Уназад гледано, раним RA је сматрано постојање симптома болести мање од 5 година. Од 90-их тај период трајања симптома смањен је на 24 месеца или мање, а последњих година раним RA се сматра трајање симптома до 12 месеци (31). Жеља реуматолога је да се период од појаве симптома до контакта лекар-болесник смањи на мање од шест месеци, а све са циљем што ранијег постављања дијагнозе и започињања терапије.

Током 2010. године су предложени нови ACR (American College of Rheumatology)/EULAR(The European League Against Rheumatism) класификациони критеријуми, са циљем да се из групе болесника са новонасталим, још увек недиферентованим артритисом, издвоји група болесника са високим ризиком за развој перзистентне ерозивне форме болести, који ће имати корист од брзог увођења антиреуматске терапије (32). Нови критеријуми као циљну групу (коју треба тестирати) истичу пацијенте који имају најмање један зглоб са клинички доказаним синовитисом. Важна новина у ACR критеријумима из 2010. године, односи се на квалитативно и квантитативно одређивање антицитрулинских протеинских антитела (АСРА). Сматра се да АСРА позитивни и АСРА негативни RA болесници имају различиту патогенезу, клиничку слику и прогнозу (33).

Зглобна захваћеност

1 велики зглоб	0
2-10 велика зглоба	1
1-3 мала зглоба (са или без захватања великих зглобова)	2
4-10 мала зглоба (са или без захватања великих зглобова)	3
Више од 10 зглобова (најмање један мали зглоб)	5

Серологија (најмање један резултата је неопходан као класификациони)

Негативни RF и негативни АСРА	0
Ниско позитиван RF или ниско позитиван АСРА	2
Високо позитиван RF или високо позитивна АСРА	3

Реактанти акутне фазе запаљења (најмање један је неопходан као класификациони)

Нормалан CRP и нормална SE	0
Повишене вредности SE или повишене вредности CRP	1

Трајање симптома

Мање од 6 недеља	0
6 недеља и више	1

Шема 1: 2010. ACR/EULAR класификациони критеријуми за RA

Рану фазу RA карактерише појава општих тегоба које су неодређене и могу трајати различито дуго. То су нелагодност, умор, губитак сна и апетита, појава благо повећаних температура и општа слабост. Први поремећај који се јавља на зглобовима је јутарња укоченост, бол и оток. Јутарња укоченост настаје као последица ослабљене циркулације и накупљања течности у периартикуларним ткивима. Трајање јутарње укочености је обично вишечасовно, при чему дијагностички значај има уколико износи више од 30 до 45 минута. Сакупљени ексудат врши компресију на околна артикуларна ткива и кост и изазива бол. Болови се у почетку осећају само при притиску, а касније и спонтано и у мировању (34, 35).

У **касној фази RA** може се видети читав низ различитих промена на зглобовима и ванзглобном ткиву. Најчешће су захваћени ситни зглобови шака и стопала, ручни и скочни зглобови и зглобови колена. Због болова, укочености и мишићног спазма, често настају изражене деформације и контрактуре зглобова. Најчешћа деформација је улнарна девијација прстију и флексиона деформација у метакарпофалангеалним зглобовима (MCP) и проксималним интерфалангеалним зглобовима (PIP). Нешто ређе се јављају деформитети скочних зглобова и зглобова ручја, коленог, раменог зглоба, цервикалне и торакалне кичме.

Поред зглобних промена релативно су честе и **ванзглобне промене**. Промене на кожи, као што су црвенило и локално повишена температура изнад захваћеног зглоба се често срећу у RA. Кожа је обично влажна а у каснијем стадијуму болести атрофична и сјајна. Релативно често се срећу реуматоидни чворићи, тендовагинитис околних тетива и бурзе (попут Бекерове

цисте). Клинички најочигледнија системска манифестација у RA јесте перикардитис. Поред перикардитиса могу се видети и ендокардитис, миокардитис, коронарни артеритис и сметње спровођења. Промене на плућима су ређе присутне и то у виду плеуритиса, реуматоидне пнеумокониозе и Каплановог синдрома. На периферном нервном систему долази до појаве периферне полинеуропатије или различитих типова мононеуритиса. Ређе се јављају промене на бубрезима, гастроинтестиналне промене, очне и ларингеалне манифестације.

Реуматоидни артритис може почети на типичан и атипичан начин.

Типичан почетак може да буде постепен, када симптоми болести настају споро у дужем временском периоду и временом постају све израженији, акутни, са појавом артритиса и других знакова болести у току неколико дана и интермитентни, где се смењују периоди погоршања и спонтаног побољшања у трајању од неколико недеља. Код највећег броја болесника локализација промена на почетку болести је типична тј. захваћени су симетрични проксимални интерфалангеални метакарпофалангеални зглобови. Код многих болесника се већ на почетку болести јављају вазомоторни поремећаји на шакама и стопалима, осећај хладноће, знојења или Raupaud феномен.

Атипични почетак најчешћи је у облику моноартритиса крупних зглобова екстремитета (колена код 50% болесника) да би се нешто касније јавила типична симетрична захваћеност.

Код нелечених болесника ток болести може бити:

-прогресиван: без ремисије са великим потенцијалом брзе деструкције захваћених зглобова у кратком временском периоду, од 2 до 5 година, виђа се код 10% болесника

-моноцикличан: стална активност болести у трајању од 2 до 3 године, потом вишемесечна ремисија, па поновно активност болести, код 20% болесника

-полицикличан: најчешћи облик, у којем се смењују фазе погоршања и побољшања, без спонтаних ремисија, са прогресивним захватањем нових зглобова и њиховом деструкцијом, виђа се код 70% болесника (36).

1.5. Радиолошка презентација реуматоидног артритиса

Једна од раних манифестација RA јесте појава циста и ерозија. Изразита склоност ка зглобним деструктивним променама је управо оно што разликује RA од других инфламаторних артропатија. Степен зглобног оштећења јесте важан параметар прогнозе исхода болести, као и параметар процене ефикасности примењене терапије.

Прогресија деструктивних зглобних промена највећа је у првим годинама болести. Деструктивна природа болести се манифестује развојем ерозија код 10-26% болесника са RA у прва три месеца од почетка болести, присуством ерозија код више од 60% болесника до краја прве године, а чак 75% болесника у прве две године има ерозивне промене (37). Зглобно оштећење је веће у прве две године трајања артритиса него у свим наредним годинама (38).

У циљу откривања зглобних промена, годинама је коришћена радиографија као водећа имагинг метода у детектовању оштећења хтрскавице и кости. Захваљујући радиолошким снимцима могуће је уочити почетне промене, али и њихову прогресију захваљујући многобројним радиолошким скор системима који се интензивно користе уназад 30-ак година. Може се рећи да радиографија, још увек, представља "златни стандард" у постављању дијагнозе реуматоидног артритиса, као и у одређивању стадијума болести, праћењу прогресије оштећења и процени напредовања болести (39). Најважнија улога радиографије је квалитативна, она региструје присуство или одсуство патолошких промена. На њену масовну употребу, упркос развоју савременијих дијагностичких поступака утичу: једноставност технике снимања, једноставност рентгенских уређаја, ниска цена, кратко време добијања радиографија, непоремећен комфор пацијената и висока специфичност радиографских промена (40). Такође, радиографија је квантитативна метода тј. на основу снимака се одређује степен прогресије болести или се процењује утицај лекова на степен напредовања болести. У употреби су многобројни радиграфски скор системи, а најчешће коришћени су Sharp van der Heijde и Larsen скор са различитим модификацијама. Поред ових бројних предности та метода има многе недостатке, као што су: штетни ефекти јонизујућег зрачења, касна појава радиографских знакова болести, лош приказ мекоткивних структура, спор развој промена, дводимензионални приказ, немогућност праћења у кратком временском року. Управо су, набројани недостаци, разлог због кога реуматолози све више прибегавају новим методама визуелизације.

Савременије методе визуелизације као што су магнетна резонанца (MR) и ултразвук (UZ) зглобова су последњих година све чешће присутне у свакодневном раду. Магнетна резонанца је значајна у процени синовијске инфламације и зглобног оштећења. Предности MR су велике: директна визуелизација меких ткива, мултипланарни приказ, визуелизација синовијског пануса, детектовање преерозивних коштаних промена и квантификовање синовитиса применом интравенских контрастних средстава. Због све већег значаја MR, интернационална MRI-OMERACT група је осмислила MR скор за RA (RAMIRS) којим се квантификују различити патолошки процеси у захваћеном зглобу: синовитис, едем кости и коштане ерозије (41). RAMIRS и други MR скор системи се користе у клиничким

исраживањима у циљу ране детекције оштећења зглоба и представљају најпрецизнији неинвазивни метод праћења прогресије зглобног оштећења (42).

1.6. Функцијска способност оболелих од реуматоидног артритиса

Реуматоидни артритис је болест коју карактерише полиартикуларно и симетрично захватање, првенствено, зглобова шака и стопала са тенденцијом ка прогресивној деструкцији зглобова која доводи до губитка функционалног капацитета (43). Смањење функцијског капацитета утиче на све аспекте живота, на свакодневне активности, професију, ментално стање и социјални статус.

Процена функцијског стања локомоторног апарата је од посебне важности не само са медицинског већ и са социоекономског аспекта. Оцењивањем овог статуса сагледавамо актуелне могућности болесника и дефинишемо постојање и степен функцијске ограничености и онеспособљености. Нажалост, још увек се мало зна о утицају реуматоидног артритиса на физичку способност појединца, при чему је један од водећих проблема њено мерење (44).

Испитивање функције мускулоскелетног система започето је још 1937. године састављањем првог индекса од стране Douglasa Taylora. Ото Steinbrocker је 1949. године предложио критеријуме које Америчко удружење реуматолога прихвата и уводи у званичну употребу 1959. године. Steinbrocker-ова скала сврставала је све болеснике у четири класе у односу на могућност да обављају активности самозбрињавања, свакодневног живота и професионалне активности. Амерички колегијум реуматолога 1991. године дефинише ревидиране ACR критеријуме функцијског статуса. Недостатак Steinbrocker-ових критеријума је недовољна прецизност у дефинисању функцијске способности болесника, па се у пракси чешће користе други упитници и индекси.

У циљу изналажења што бољих могућности за оцену функцијског стања болесника са RA, последњих тридесетак година предложени су разни тестови и индекси од којих су најпознатији:

- Функцијско мерење полиартритиса- Convery 1977.
- Индекс функцијског статуса (Functional Status Index- FSI)- Jette 1978.
- Упитник процене здравственог стања (Health Assessment Questionnaire-HAQ)- Fries 1980.
- Скала мерења степена артритиса (Arthritis Impact Measurement Scalles- AIMS)- Meenan 1980.

- Упитник Mc-Master-овог индекса здравља (McMaster Health Index Questionnaire-MHIQ)-Tugwell 1987.
- Интернационална класификација WHO (International classification of functioning, disability and health (ICF) (45).

Двадесетак година уназад испитивање здравственог стања болесника поднело је промене од биохемијског, радиолошког и физичког испитивања до самосталног оцењивања здравственог стања (46). Најчешће коришћен упитник у реуматологији је Health Assessment Questionnaire (HAQ) и његова модификована верзија (MHAQ). HAQ су први пут користили 1978. године James F. Fries и колеге са Стандфорд универзитета. То је једно од првих испитивања функцијског статуса где болесник сам одговара на задата питања и временом ће постати један од доминантних инструмената у истраживању (46, 47). У последњих двадесет година HAQ се показао као ефикасна и сензитивна метода у мерењу функцијске способности. Преведен је на 60 језика и коришћен у више од 500 светских студија (47). У студији Kirwona и осталих спроведеној 2003. године показано је да већина болесника радије одговара на питања, добијеним у писаној форми, без присуства истраживача (48).

HAQ упитник је најједноставнији и најјефтинији инструмент у реуматолошком истраживању (49). Овај упитник има добру прогностичку вредност не само за функцијски статус већ и за радну способност и морталитет. Као и многи други истраживачки инструменти HAQ има недостатке као што су: субјективност одговора, односно субјективни доживљај степена потешкоћа у извршавању свакодневних активности, затим немогућност регистравања степена погоршања функцијског статуса, који је последица тренутне активности реуматоидног артритиса и пада функције као последице дуготрајног кумулативног и иреверзибилног зглобног оштећења. Такође, овај упитник не узима у обзир неспособност насталу због психијатријских поремећаја, социјални статус испитаника и ниво образовања (47). И поред ових недостатака HAQ упитник је најчешће примењиван упитник у реуматолошким истраживањима широм света.

Функцијску способност одређују активност болести, структурно оштећење али и психосоцијални параметри (50, 51). Активност болести има битну улогу у губитку функционалног капацитета, нарочито у раној фази болести (52, 53). Истраживања показују да је ниво функцијске способности на почетку болести највећи предиктор функцијске неспособности у каснијим фазама болести (52). У раној фази реуматоидног артритиса инфламација је главна детерминанта неспособности, док је након више година трајања артритиса зглобна деструкција одговорна за смањење физичке способности болесника (54).

Такође, веће зглобно оштећење на почетку испитивања у вези је са нижом функцијском способношћу и њеним slabим напредовањем након адекватне терапије. Стога је разумљива важност ране интервенције, у време инфламације, како би се спречио развој и успорила прогресија зглобне деструкције (55).

1.7. Терапијски приступ у лечењу болесника са реуматоидним артритисом

Циљ терапије RA је да контролише инфламацију, смањи ниво бола, успори прогресију зглобне деструкције, смањи губитак функционалне способности и омогући болесницима да се баве свакодневним активностима у што дужем временском периоду. То подразумева да запаљенски процес треба зауставити на нивоу синовије, пре развоја иреверзибилних промена у зглобу, што се може учинити само код рано дијагностикованог RA. Уколико је дошло до деформације зглобова, терапија има за циљ да спречи нове и успори развој постојећих оштећења, или пак, ако је настало велико оштећење зглобова, да одржи њихову функцију и спречи настанак инвалидности (56).

Терапија RA болесника захтева мултидисциплинарни приступ стручњака из различитих области, при чему водећу улогу имају реуматолози, који заједно са болесником доносе одлуку о начину лечења RA. Терапија обухвата примену лекова, физикалну терапију, а у завршној фази оштећења зглоба и хируршку интервенцију.

Савремени концепт лечења RA, се заснива на смерницама NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence), почива на неколико препорука: 1. рано постављање дијагнозе (током прва три месеца до шест месеци од појаве тегоба); 2. рано агресивно лечење малим дозама стероида и увођење оптималних доза метотрексата (10-25 мг недељно), уз постепено смањивање дозе и укидање кортикостероида; 3. уколико нема задовољавајућег ефекта или се јаве знаци нетолеранције метотрексата, уводи се биолошки лек (најчешће анти-TNF); и 4. уколико после 3-6 месеци нема задовољавајућег одговора, покушати лечење другим биолошким леком (најчешће блокатор CD20) (57).

Последњих година на подручју медикаментозне терапије постигнути су значајни успеси. Неколико је врста лекова који се користе у терапији реуматоидног артритиса:

1. *Аналгетици* су ефикасни у отклањању болова и најчешће се користе као додатак НСАИЛ и ЛМТБ, ради додатног смањивања болова, али не утичу на ток болести.

2. *Нестероидни антиинфламаторни лекови* утичу на смањење бола и запаљења. Препоручују се НСАИЛ са умереном СОХ-2 селективношћу а то су мелоксикам и нимесулид.
3. *Лекови који могу да мењају ток болести-Disease modifying anti-rheumatic drugs-DMARD* могу да успоре напредовање оштећења (радиолошки видљивих) зглобова, сачувају функцију зглоба, одрже радну способност болесника, поправе квалитет живота и смање укупне трошкове лечења. ЛМТБ су метотрексат, сулфасалазин, хидроксихлорохин, хлорохин, Д-пенициламин, соли злата, азотиоприн, циклоспорин, лефлуномид. Ови лекови делују као имуномодулатори различите хемијске структуре, фармакодинамских и фармакокинетских особина. Лек избора за лечење RA, међу ЛМТБ, је метотрексат.
4. *Биолошки лекови* који се употребљавају за лечење RA су протеински молекули намењени неутрализацији проинфламаторних цитокина, првенствено TNF и у мањој мери IL-1. То су: антагонисти TNF-алфа- Adalimumab (Humira), Etanercept (Enbrel), Infliximab (Remicade), антагонисти IL-1 рецептора-Anakinra, блокатори IL-6 Tocilizumab и анти CD20-Rituximab (Mabthera) и инхибитор активације Т лимфоцита- Abatacept. Група биолошких лекова који су у клиничкој употреби се, према механизму свог деловања, дели на: 1) анти-TNF лекове (Etanercept, Infliximab и Adalimumab); 2) блокаторе IL-1 (Anakinra); 3) блокаторе IL-6 (Tocilizumab); 4) блокаторе костимулаторних сигнала (Abatacept); и 5) блокаторе CD20 В лимфоцита (Rituximab)
5. *Системски кортикостероиди*- орални и парентерални.

Принцип лечења овим лековима се заснива на равнотежи између чињеница да након примене кортикостероида долази до пролазног смањења јачине запаљења, поправљања функције система за кретање и превентивног дејства на радиолошку прогресију болести са једне стране, и доказа да дуготрајна терапија и мањим дозама ових лекова води ка значајним нежељеним појавама са друге стране. То је разлог због кога је увек неопходно размотрити индивидуалне факторе ризика за нежељена дејства кортикостероида.

MTX је први препоручени DMARD код активног RA. Минимална дужина терапије MTX-ом након које се процењује његова ефикасност је три месеца. У почетној фази болести, као адјувантна терапија саветује се употреба ниских и умерено високих доза kortikosteroida. Уколико се за три до шест месеци не постигне адекватан терапијски одговор, а нема лоших прогностичких фактора, предлаже се промена

DMARD или комбинована терапија хемијских DMARD. У случају изостанка терапијског одговора MTX-у треба додати биолошки лек, првенствено анти TNF алфа агенс. Уколико при употреби анти TNF-а нема довољног смањења активности болести, препорука је заменити га другим болест модификујућим леком из групе TNF инхибитора или селективних блокатора CD20 лимфоцита. Студије су показале да уколико болесници не одговоре на један анти TNF препарат вероватно неће адекватно одговорити на други лек из исте групе (57). У случају постојања рефрактарног RA и контраиндикација за примену биолошког лека, MTX се може заменити или комбиновати са азотиоприном, циклоспорином, циклофосфамидом (58).

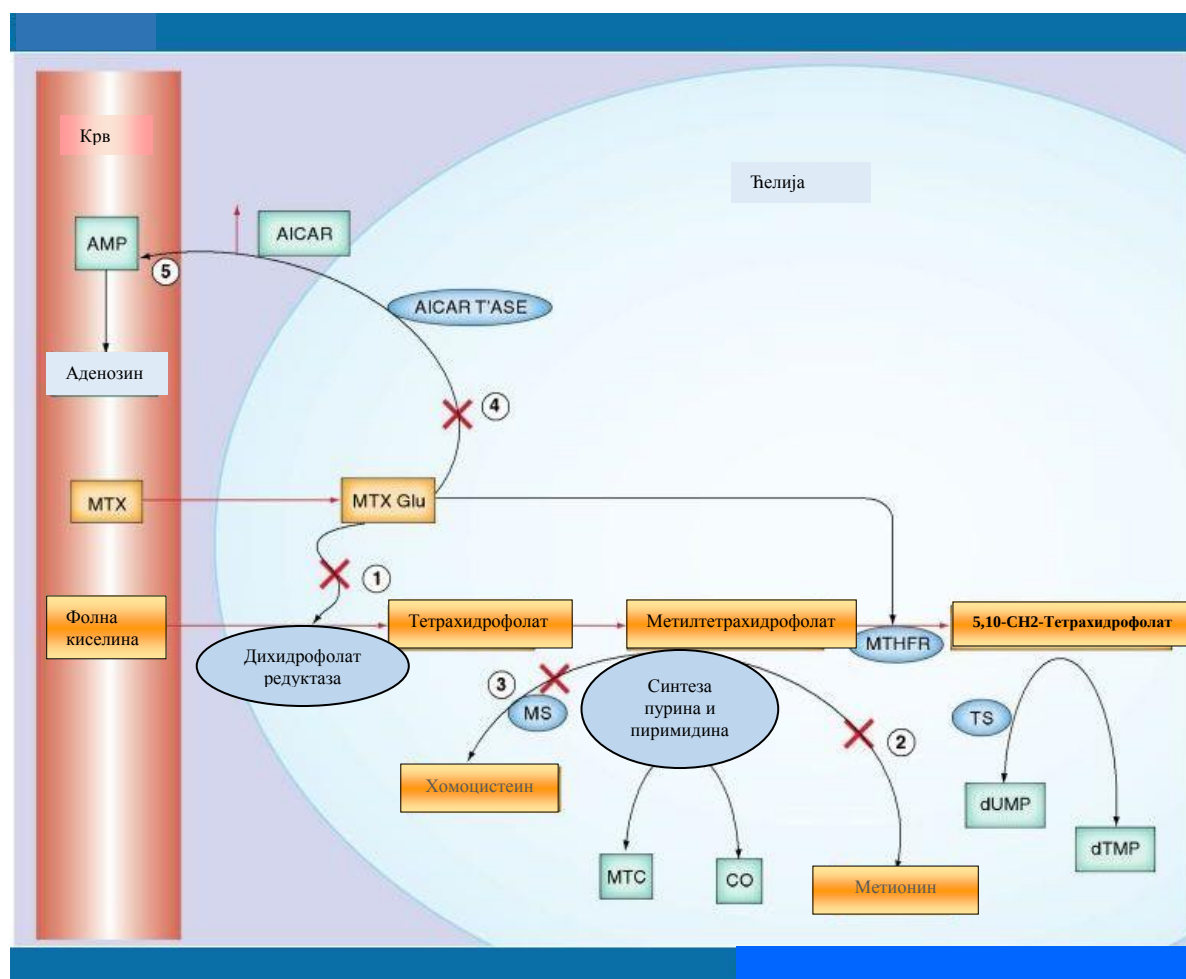
Опште прихваћен је став да су за успех терапије RA одговорни следећи чиниоци:

- рана дијагноза;
- могућност одређивања прогностичких фактора, тј. предвиђања будућег тока болести ради доношења одлуке о примени одговарајућег лека са максималним терпијским ефектом, без нежељених ефеката или са минималним нежељеним ефектима;
- рана примена "агресивних" лекова, с циљем да се заустави инфламација синовије;
- рана превенција деформитета и контрактура зглобова, побољшање њихове функције применом одговарајућих процедура физикалне терапије и рехабилитације.

Мале дозе MTX у лечењу ове болести су уведене још 1985. год, а због доказане ефикасности, прихватљиве сигурности и ниске цене (59), MTX је постао основа у терапији RA, те је данас то, најчешће, први болест модификујући лек који болесник добије. Након абсорпције 10% овог лека конвертује у 7-хидрокси MTX у јетри, а затим се оба излучују преко бубрега (60, 61).

Објашњено је неколико фармаколошких механизма деловања MTX укључујући инхибицију синтезе пурина и пиримидина, супресију трансметилационе реакције која доводи до акумулације полиамина, редукцију антиген зависне Т ћелијске пролиферације и ослобађање аденозина. Комбинација ових механизма је одговорна за антиинфламаторни ефекат MTX. Веома важан је ефекат MTX на метаболизам пурина, односно антиинфламаторни ефекат посредован стимулацијом аденозинских рецептора (61). Наиме, MTX доводи до пада нивоа аденозин дезаминазе (ADA) на три начина: прво, MTX може директно инхибирати ADA, друго, MTX инхибира ADA индиректно посредством аминоксидозол карбоксамида рибозил-5-фосфата (AICAR) и његових метаболита, и треће, ADA

може бити инхибирана индиректно како би се компензовало смањење аденозина. Смањење ADA доводи до пораста аденозина и последичног антиинфламаторног ефекта (62).



Слика 2. Ефекат фолне киселине и метотрексата на синтезу пурина и пиримидина и ниво екстраћелијског аденозина- адаптирана слика преузета од Tian H (60)

Након што фолна киселина уђе у ћелију она се трансформише у дихидрофолат и тетраhydroфолат помоћу дихидрофолат редуктазе. Тетрахидрофолат је повезан са 5,10-метилентетрахидрофолатом преко ензима 5,10-метилентетрахидрофолат редуктазе која има важну улогу у синтези пурина. Са друге стране, када MTX уђе у ћелију он инхибише дихидрофолат редуктазу која посредује у синтези пурина и пиримидина. У свом полиглутаминском облику инхибише и ензим AICAR доводећи до акумулације аденозина који даље испољава антиинфламаторне ефекте преко аденозинских рецептора (63).

1.8. Метаболизам пурина

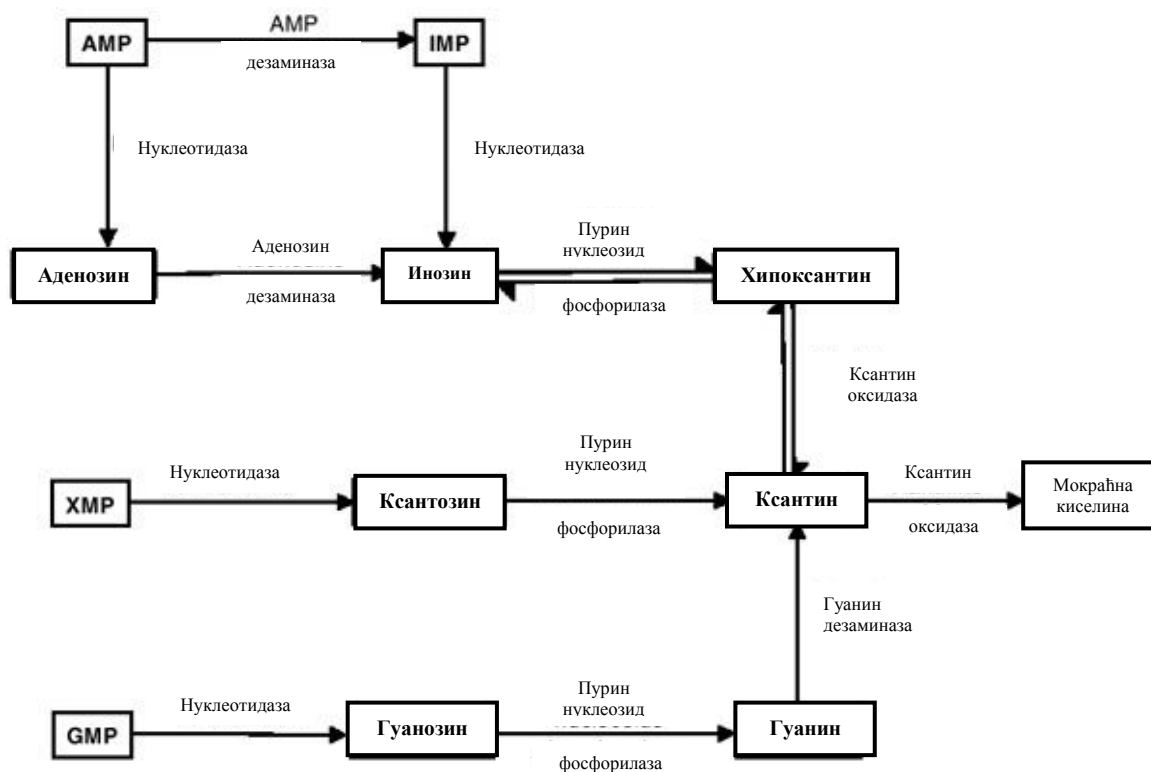
Пурински нуклеотиди у адекватној интрацелуларној концентрацији су од великог значаја за сваку живу ћелију, јер су као даваоци енергије укључени у многе метаболичке процесе, а представљају почетни материјал за синтезу нуклеинских киселина. Неки од ензима укључених у метаболизам пуринских нуклеотида, везани су за мембрански систем. Као важан моменат у синхронизованом деловању низа ензима на нивоу функционално-опречних метаболичких путева је присуство мултиензимских комплекса као и постојање различитих физико-хемијских константи ензима укључених у овај метаболизам (64).

Три су основна пута метаболизма пурина: де ново синтеза, катаболизам и *purine salvage*-реутилизација.

Пурински нуклеотиди могу бити синтетисани на два начина. Један начин јесте када пурины почињу синтезу "de novo" од једноставних почетних материјала као што су аминокиселине и бикарбонат. Пуринске базе синтетишу се већ причвршћене на прстен рибозе (65). Други, алтернативни, је онај у коме се пуринске базе, које се отпуштају хидролитичком разградњом нуклеинских киселина и нуклеотида, могу поново искористити, што се означава као реутилизација (поновно коришћење) база или "purine salvage pathway" (пут спашавања пурина).

Пурински путеви спашавања су посебно битни због уштеде енергије. Највећи део пурина синтетише се де ново и то око 4ммол/дан, а слична се количина разграђује дајући спојеве који се могу поново искористити за синтезу. Синтеза пурина де ново је најактивнија у јетри. Међутим, еритроцити и полиморфонуклеарни леукоцити су неспособни да синтетишу пурине на овај начин. Такође, нервне ћелије не поседују могућност де ново синтезе, па мозак при формирању пуринских нуклеотида зависи од егзогених пурина. То је и разлог због кога се у ћелијама користи секундарни пут синтезе нуклеотида из већ готових пуринских база (66).

Катаболизам пурина је континуирани процес који почиње од нуклеинских киселина, где под дејством ензима ендонуклеазе почиње катаболизам DNK i RNK до нуклеотида. Обзиром да се ослобођени нуклеотиди не могу у том облику користити за синтезу нових нуклеинских киселина (осим AMP који може учествовати у ресинтези), њихова разградња иде кроз два метаболичка пута. Један пут, подразумева дезаминацију AMP коју катализује аденозин монофосфат дезаминаза (AMP дезаминаза) до IMP, а дефосфорилацијом IMP настаје инозин. Други катаболички пут јесте алтернативни, и подразумева претходну дефосфорилацију AMP путем 5'-нуклеотидазе до аденозина, а затим се аденозин дезаминише у инозин у реакцији коју катализује аденозин дезаминаза (67).



Слика 3. Катаболизам пуринских нуклеотида- адаптирана слика преузета из Curr Med Res Opin 2004

Важни чиниоци пуринског циклуса, који имају доминантну улогу у регулацији концентрације аденилних нуклеотида су: 5'-нуклеотидаза (5'-NT), AMP деаминаза, аденозин деаминаза и ксантин оксидаза (ХО).

Аденозин је нуклеозид који се састоји од молекула аденина везаног за рибозни шећер (рибофуранозу) путем β -Ng-гликозидне везе. Овај нуклеозид има важну улогу у биохемијским процесима, попут трансфера енергије путем аденозин-трифосфата (АТР) и аденозин-дифосфта (ADP), као и трансдукцији сигнала путем цикличног аденозин монофосфата (сAMP) (68, 69).

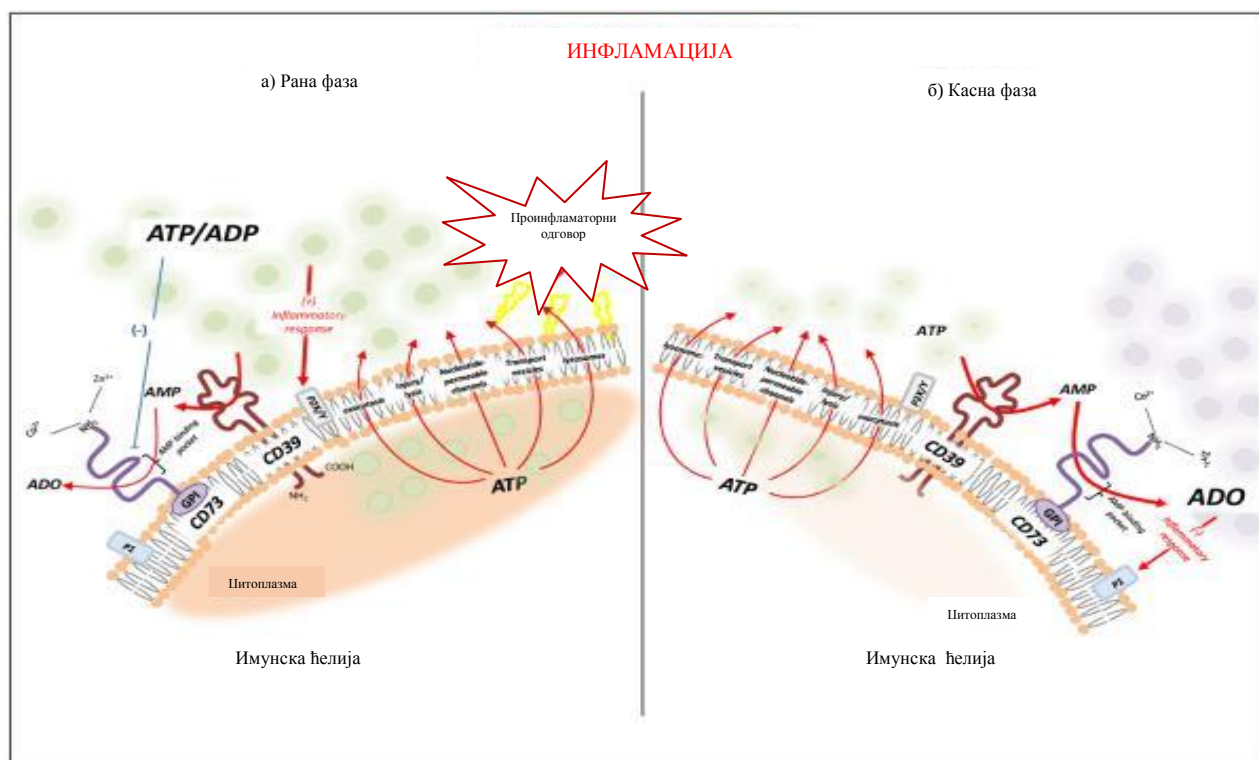
Аденозин је интермедијат на путу разградње интраћелијског аденозин трифосфата који се у присуству 5-нуклеотидазе ствара из AMP реакцијом дефосфорилације. Он делује као локални хормон те представља информациону везу између ћелија и ткива. Постојање и активност аденозина у ћелијама је регулисано активношћу ензима који га метаболишу.

Континуирани циклус између аденозина и АМР, уз активност ензима 5'-NT и аденозин киназе, дешава се у хепатоцитима, миокарду и нешто мање у лимфоцитима експерименталних животиња.

Аденозин има кратак полуживот због чега је његово физиолошко дејство локализовано. Овај нуклеозид се у ткивима налази у малој концентрацији, али до његове акумулације у екстрацелуларном простору долази брзо у случају хипоксије и инфламације (70). Екстраћелијски аденозин настаје дејством ектонуклеотидаза на површини неутрофила, маст ћелија, срчаних фибробласта и активисаног ендотела при развоју инфламаторног процеса. Циркулишући аденозин, настао селективним ослобађањем нуклеотида из ћелија крвних судова срца и мишића у току хипоксије, својим дејством локалног хормона доводи до појачаног протока крви и реактивне хиперемije, што указује на моћно вазодилаторно дејство овог медијата (71).

Своје ефекте аденозин испољава преко специфичних рецептора тзв. аденозинских рецептора. Ови рецептори су у различитим ткивима дефинисани као А1, А2А, А2В и А3 рецептори. При активацији А2 (рецептор малог афинитета) рецептора, повећава се интрацелуларни ниво сАМР стимулацијом аденил-циклазе. Инхибиторни А1 и А3 (рецептори великог афинитета) активирањем доводе до инхибиције аденил-циклазе и смањења интрацелуларног сАМР (72).

Ензимска активност CD39 (екто-нуклеозид трифосфат дифосфохидролаза 1, E-NTPD1) и CD73 (екто-5'-нуклеотидаза, Ecto5'-NT) има стратешку улогу у подешавању трајања, величине и хемијске природе пуринергијског сигнала који се испоручује имунским ћелијама преко конверзије ADP/ATP у АМР и аденозин. Пуринергијски медијатори, као што су АТР и аденозин, ослобађају се у екстраћелијски простор у одговору на метаболичка дешавања. АТР бива ослобођен током лизе ћелија али и у нелиничким променама. Пратећи ослобађање АТР у екстраћелијски простор, CD39 конвертује АТР у АМР а затим CD37 дефосфорилише АМР у аденозин (73). Поред CD39 и CD73, који представљају основне ензиме метаболизма нуклеотида који регулишу имуни и инфламаторни одговор, постоје и други, мање разјашњени ензими на површини ћелија који су укључени у катаболизам екстраћелијских нуклеотида, као што су алкалне фосфатазе, пиропхосфатазе и фосфодиестеразе. Аденозин и АТР активирају рецепторе P1 и P2 на површини имунских ћелија који затим посредују у имуномодулаторним ефектима пурина.



Слика 4. Улога CD39 и CD73 у инфламацији- адаптирана слика преузета од Antonioli L и сар. (74)

CD39 и CD73 представљају "пуринергијски хало" који окружује имунске ћелије. Појава патолошког догађаја, као што је инфламација, доводи до акумулације АТФ који отпочиње низ проинфламаторних дешавања. Међутим, негативна повратна спрега такође узима учешће у овом дешавању, обзиром да је пораст АТФ праћен сегментном деградацијом до АМР помоћу CD39 и до аденозина уз помоћ CD73. Аденозин затим смањује активност имунских ћелија и испољава јак антиинфламаторни ефекат (74).

Преко својих рецептора, аденозин утиче на продукцију цитокина и ублажава штетне ефекте проинфламаторних цитокина $\text{TNF-}\alpha$ и IL-1 (75).

1.8.1. Структура и значај 5'-нуклеотидазе

5'-нуклеотидаза-5'-рибонуклеотид фосфохидролаза је фосфомоноестераза, обзиром да катализује хидролитичко разлагање 5'-монофосфата уз издвајање неорганског фосфора. Највећим афинитетом катализује разградњу АМР-а ($5'\text{AMP} > 5'\text{UMP} > 5'\text{CMP} > 5'\text{GMP} > 5'\text{IMP}$).

5'-NT се може наћи у два облика: као екстрацелуларни (мембрански) ензим и интрацелуларни. Резултати појединих истраживања показују да вероватно постоји и трећа и четврта форма овог ензима са различитим функционалним карактеристикама (76). Овај ензим

представља интегрални део ћелијске мембране, односно, локализован је на спољашњој страни плазма мембране ћелија. Нешто мање је локализован и у другим ћелијским структурама као што су митохондрије, Голџијев апарат, ендоплазматски ретикулум, цитоплазма.

Имунохемијски идентичне форме ензима су доказане у јетри, слезини, бубрезима, плућима, мозгу и скелетним мишићима. Ензима има и у леукоцитима и макрофазима.

Прихватање нуклеотида од стране ћелија могуће је уколико су дефосфорилисани, па би централна улога 5'-нуклеотидазе била у продукцији екстрацелуларних нуклеозида, од којих је најважнији аденозин. Да ли је ензим укључен у трансцелуларни транспорт нуклеозида још увек није утврђено. Поједини истраживачи сматрају да је ензим локализован у близини транспортног система, али нема транспортну улогу (77). Други, приписују 5'-нуклеотидази значајну улогу у транспорту нуклеозида (аденозина) кроз ћелијску мембрану, при чему њен угљенохидратни део може играти улогу у препознавању везујућих места, док би процес дефосфорилизације могао да активира рецепторски конституент и убрза трансфер.

Активност овог ензима је зависна од старости и пролиферативног статуса ткива, па је знатно нижа у млађим и пролиферативно активним ткивима, а значајна му је улога и у ћелијској диференцијацији (64). У еритроцитима је 5'-NT локализована у цитоплазми где врши дефосфорилизацију примидинских и деоксипиримидинских нуклеотида. У лимфоцитима је овај ензим одговоран за обезбеђивање довољног броја нуклеотида за синтезу нуклеинских киселина, у случају недовољне де ново синтезе нуклеотида. Сматра се да је екто-5'-NT маркер матурације хуманих В-лимфоцита, обзиром да његова експресија расте у току нормалног развоја, а знатно се редукује у имунодефицијентним стањима болесника (78). Иако циркулишући моноцити показују ниску активност екто-5'-NT, диференцијација моноцитне лозе доводи до пораста активности овог ензима (77).

Код здравих особа нема пораста 5'-нуклеотидазе, тј. њена активност је ниска. Такође, ниво овог ензима се не повећава у гравидитету и у дечјем узрасту. До повећења активности серумске 5'-нуклеотидазе долази у болестима које су праћене ретенцијом жучи.

Повећана активност 5'-NT се среће у инфламаторним артропатијама као што су RA, псоријаза, улцерозни колитис, Whipple-ова болест и дерматомиозитис. У реуматоидном артритису активност 5'-NT је повишена у синовијској течности а по многим ауторима активност овог ензима је повећана и у серуму (79). Пораст 5'-NT у синовијској течности је од дијагностичког значаја, обзиром да су концентрације овог ензима код неинфламаторних болести нормалне. Многе студије које су се бавиле пореклом ензима у синовијској течности, показале су да што је већа активност болести веће су вредности 5'-NT и полиморфонуклеарног одговора, као и да са порастом лизозомалних ензима у синовији долази до повећања броја

леукоцита, па је закључак да ови ензими настају услед деструкције белих крвних зрнаца (80). Међутим, каснија истраживања (81) су показала да 5'-NT води порекло из синовијских ћелија, а хистохемијски је показано да се највећа концентрација овог ензима налази у површинским ћелијама.

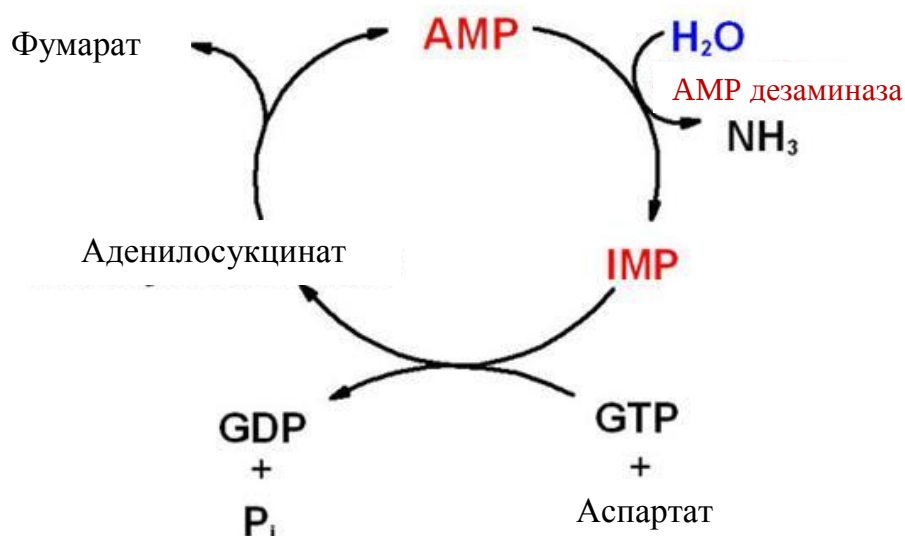
1.8.2. Структурне и каталитичке особине аденозин монофосфат дезаминазе

Аденозин монофосфат дезаминаза (АМР дезаминаза; АМР аминоксидролаза; Е.С. 3.5.4.6.) катализује иреверзибилну хидролитичку дезаминацију АМР у ИМР и амонијак.

АМР дезаминаза хуманог порекла има четири изоформе и то: М (мишићна), L (јетрина), E1 и E2 (еритроцитна) изоформа. Ове изоформе ензима се разликују по кинетичким, регулаторним, имунолошким и хроматографским специфичностима. Код појединих типова мишићних дистрофија је показан дефицит М форме. Изоензими E1, M и L су тетрамери састављени од идентичних субјединица и показују минималне разлике у односу на молекулску масу. Изоензими АМР дезаминазе имају различиту дистрибуцију у хуманим ћелијама крви па се тако E1 налази у еритроцитима, E2 у гранулоцитима, L у моноклеарним ћелијама, тромбоцитима и Т лимфобластима, док је E1-L хибрид присутан у лимфобластима (82).

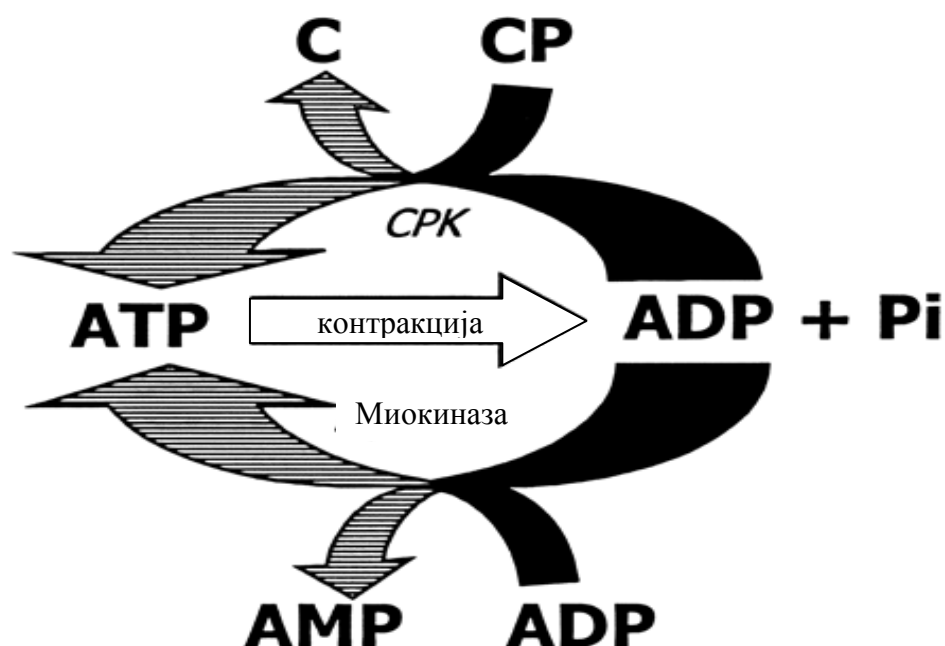
Истраживања овог ензима и његових изоформи су нарочито вршена на пацовима. Изоензими АМР дезаминаза пацова носе другачије називе и то А, В и С изоформа.

Реакција коју катализује АМР дезаминаза један је од сегмента аденилатно-нуклеидног катаболизма. Овај нуклеотидни метаболизам је нарочито повећан у условима аноксије.



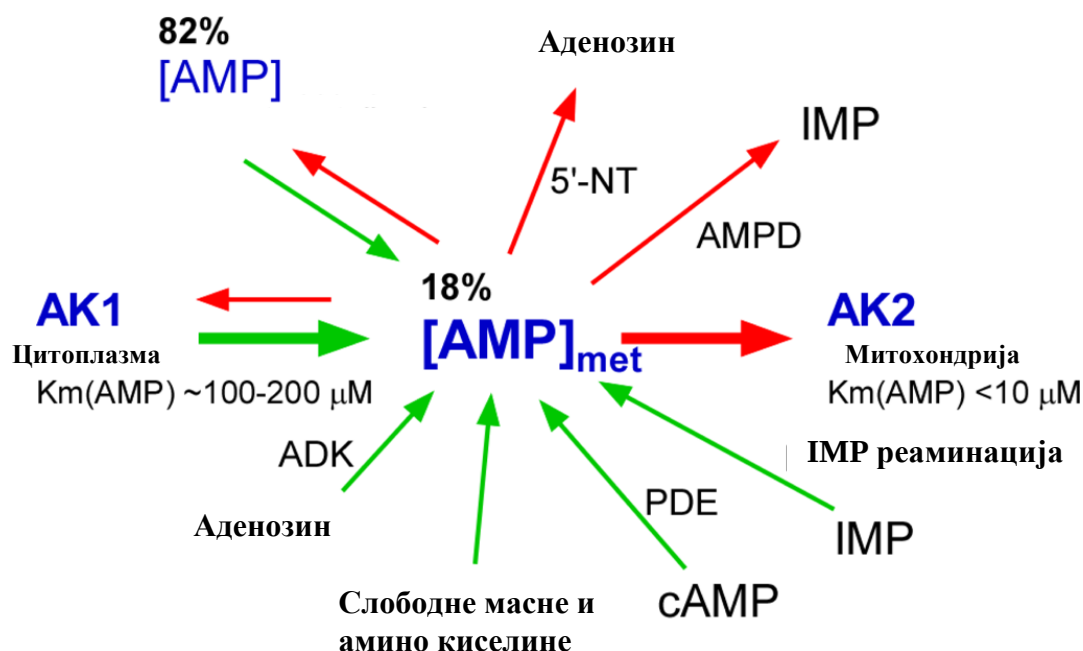
Слика 5. Стварање фумарата циклусом пуринских нуклеотида- адаптирана слика преузета од Winder WW и cap.(83)

Синтеза AMP из IMP и пут спашавања IMP посредством катаболизма AMP има улогу у дезаминацији аспартата у фумарат. Управо овај процес је од великог значаја за мишићне ћелије. Наиме, пораст мишићне активности захтева пораст активности Кребсовог циклуса са циљем да се произведе више NADH (никотинамид аденин динуклеотид) потребног за продукцију АТФ. Међутим, мишићи оскудевају у већини ензима анаплеуротичних реакција, због чега обнављају посреднике Кребсовог циклуса у облику фумарата створених циклусом пуринских нуклеотида (83). Стварање фумарата обезбеђује скелетне мишиће јединим извором анаплеуротичног супстрата за Кребсов циклус. Како би се ова радња наставила и током вежбања, мишићни протеин мора бити употребљен како би се обезбедио аминокиселина за стварање аспартата. Стварање аспартата се дешава захваљујући стандардној реакцији трансаминације у којој долази до интерконверзије аминокиселине у облик глутамата а затим глутамат у облик аспартата. Миокиназа (аденилат киназа) је специфична изоензимска форма AMP дезаминазе и дефицијенција овог изоензима доводи до замора, грчева и миалгија након вежбања (84).



Слика 6. Смањење CP и повећање AMP у мишићима током контракције- адаптирана слика преузета од Winder WW и cap.(83)

Скелетни мишићи поседују јединствену могућност да у току рада користе енергију хиљаду пута већу у односу на период одмора. Ови велики захтеви за енергијом представљају за мишићне ћелије велики изазов. Суштински значајан ензим који превенира губитак енергије при великим захтевима је AMP дезаминаза. Наиме, два ензима су одговорна за релативно стабилну концентрацију АТФ у мишићима, који при контракцији користе АТФ у већој количини. Миокиназа трансформише фосфат из једног АДР у други доводећи до продукције АМР и АТФ. Пораст слободног АДР доводи до пораста АТФ који омогућава одржавање реакције. Када се контрахују мишићи расте концентрација АМР као одраз активности мишића. Други ензим одговоран за промену нивоа АТФ је креатин фосфокиназа. Током контракције скелетних мишића, фосфат може бити преведен из креатин фосфокиназе у АДР стварајући АТФ. Тако долази до смањења креатин фосфокиназе и пораста АМР у мишићним влакнима у току контракције (83).



Слика 7. Регулација нивоа интраћелијског AMP- адаптирана слика преузета од Dzeja P и сар.(85)

Цитоплазматска аденилат киназа (AK1) је основни извор AMP, док митохондријална AK2 изоформа представља главни механизам AMP подешавања. AMP настаје током активације слободних масних и аминокиселина, током рефосфорилације аденозина помоћу аденозин киназе, током IMP реаминације и преко цикличних нуклеотид фосфодиестераза. Смањење кисеоника и мишићна контракција повећавају AMP кретање преко аденозина и IMP пута уз помоћ 5'-NT и AMP. Дефект у митохондријалном метаболизму може да смањи подешавање капацитета AMP од цитоплазматске аденилатне киназе а са друге стране може да преокрене реакцију у правцу стварања AMP (85). Метаболички активна резерва AMP обезбеђује 10-20% и у динамичкој је равнотежи са преграђеним AMP (83).

1.8.3. Структура и значај аденозин дезаминазе

Аденозин дезаминаза (ADA; аденозин аминоксидролаза; E.C.3.5.4.4), је ензим метаболизма пурина, који катализује иреверзибилну реакцију хидролитичке деаминације аденозина на тај начин га преводи у инозин уз ослобађање амонијака. Обзиром да код људи нема изражене активности "аденазе" није могуће извршити хидролизу слободне пуринске базе аденина, па разградња пурина управо почиње од AMP и аденозина.

Ген за аденозин деаминазу је лоциран на хромозому 20 (20q13). По структури, овај ензим је гликопротеин, стабилан у рН интервалу 4 до 10, док је оптимални рН за хуману ADA око 7 (86). Ензим је стабилан на температури 2 до 8 °C шест до осам месеци, а само 15 минута на температури од 65°C. Инхибиторно на ADA делују катјони Ag, Hg, Cu, Pb, Zn, а селективну инхибицију на митохондријални ензим врше Cu и Mo (87). Ензим се такође инхибира сулфхидрилним реагенсом, р-хлормеркурифенилсулфонатом, гуанидином, 2-аминопурином, биуретом, а коформицин је компетитивни инхибитор ензима. За активност ADA је неопходно присуство SH-групе у активном центру.

Гел филтрацијом су изоловане четири различите форме ADA, обзиром да у хуманим ткивима ADA егзистира у мултиплим молекуларним формама. Три солубилне, интерконветибилне форме су: мала, молекулске масе 3600, интермедијарне форме, молекулске масе 114000 и велика са молекулском масом 298000 D (далтона). Мала форма ADA се може у присуству конверзујућег фактора, једног везујућег солубилног цитоплазматског гликопротеина претворити у велику форму не мењајући кинетичке особине ензима. Велика и интермедијарна форма ензима спонтано дисосују у малу форму. Четврта форма молекулске масе веће од 200000, везана за субцелуларне органеле, која се може појавити у мањој молекулској форми масе 36000 након третмана нејонским детерџентима, али која се не може реконструисати, јесте партикуларна форма (88). Аденозин дезаминазу детерминишу два алелна гена, ADA1 и ADA2 чијом експресијом се ствара више ензимских фенотипова, и то ADA 1-1, ADA 2-1 и ADA 2-2 (89).

Код људи је активност овог ензима присутна у скоро свим ћелијама и ткивима, а најбогатији су слезина, дуоденум, желудац, јејунум, панкреас, мозак, надбубрежне жлезде и миокард. У хуманим ћелијама активност ADA је локализована већим делом у цитосолу, а само 3% укупне ћелијске активности је везано за субцелуларне органеле. Опсежна истраживања су показала да се ADA налази на површини многих ћелија, као и да је везна за мембрану еритроцита и тромбоцита, те овај ензим представља и ектоензим. Верује се да ADA, као ектоензим, својим везујућим протеином учествује у транспорту аденозина да би затим извршила његову дезаминацију, или пак, транспортује дезаминацијом већ створен инозин (90).

Екто ADA своје екстраензимске активности остварује у интеракцији са везујућим протеином CD26 који има активност ензима, при чему контакт ADA са CD26 антигеном представља важан костимулаторни сигнал за Т лимфоцит (91, 92).

ADA каталише иреверзибилну хидролитичку дезаминацију аденозина и деоксиаденозина у инозин и деоксиинозин, као део пута рециклирања пуринских база. Овај

ензим доприноси регулацији унутарћелијских и ванћелијских концентрација аденозина и деоксиаденозина заједно са 5'-нуклеотидазом и аденозин-киназом. Иако је главна функција ADA развој имуног система код људи, чини се да је повезана са диференцијацијом епителних ћелија и моноцита, те узима учешће у инфламаторном одговору.

Познато је да у хипоксији расте ниво аденозина, а његова концентрација је од пресудне важности у одржавању ендотелне функције крвних судова у ендотелној хипоксији. Супротно, хронични пораст аденозина може бити јако штетан и у корелацији је са степеном инфламације (93).

Дуготрајни пораст аденозина може бити јако токсичан. Истраживања показују да код хронично хипоксичних особа, хипоксија доводи до паралелне индукције екстрацелуларне ADA и CD26. Тако индукована ADA ензимски је активна и везана за спољну страну мембране преко CD26 формирајући комплекс одговоран за деградацију екстрацелуларног аденозина (94). Механизам којим ADA излази из ћелије и везује се за CD26 још увек је непознат. Предпоставља се да ADA "исцури" из оштећених ћелија у стањима хипоксије и инфламације (93). Подаци из литературе показују да ADA може бити везана за површину ћелије и преко A1 и A2b рецептора аденозина. Хумане студије показују да веза ADA са CD26 на мембрани може бити прекинута третманом HIV gp120, протеином.

У експерименталним студијама је показано да деоксиикоформицин (dcF), инхибира ADA, повећава протективни одговор аденозина код пропустљивости мембране и акумулације неутрофила (95, 96).

ADA је маркер ћелијски посредованог имунитета. До сазнања о њеној улози у ћелијски посредованом имунитету, дошло се испитивањем пацијаната са израженом имунодефицијенцијом. Истакнуто је да активност серумске ADA представља одраз моноцитно/макрофагне активности у различитим болестима (97). Већа активност серумске ADA је забележена код многих инфекција изазваних микроорганизмима као што је туберкулоза, лепра, бруцелоза и HIV инфекција. Такође, повишене вредности ADA су забележене у инфаркту миокарда и нестабилној ангини пекторис (98).

У RA расте каталитичка активност ADA2 изоензима, те може бити користан биохемијски маркер у дијагностици и праћењу RA. Смањење каталитичких активности изоензима ADA1 у серуму пацијената са RA, који су добили MTX, може да помогне у праћењу терапијских ефеката MTX (99). Још увек није у потпуности јасно шта тачно узрокује пораст каталитичке активности ADA код RA болесника, али се претпоставља да је каталитичка активност овог ензима у порасту због ослобађања из оштећених ћелија и повећане ћелијске пролиферације (100).

1.8.4. Ксантин оксидаза у метаболизму пурина

Ксантин оксидаза (кисеоник оксидоредуктаза) је ензим, чија је најважнија улога конверзија хипоксантина и ксантина до мокраћне киселине, у пуринском катаболичком путу. Ради се о регулаторном ензиму деградације нуклеинских киселина, што значи да он детерминише да ли ће се пуринске базе усмерити у правцу реутилизације или даље и коначне деградације до мокраћне киселине.

ХО и ксантин дехидрогеназа (XD) су металофлавопротеини, алтернативне форме истог генског продукта (101). Активна форма ензима јесте хоомодимер молекуларне масе 290 kD кога чине две субјединице. Ове субјединице су идентичне и свака од њих је састављена су од N-терминалног дела који садржи два гвожђе/сумпор центра и флавин аденин динуклеотид (FAD), и C-терминалног дела на коме је један молибденски центар. Оксидација супстрата се врши посредством молибденског центра, који чини везу између супстарта и ензима (102). Оксидативна реакција у ХО се догађа на флавин месту, а сматра се да гвожђе /сумпор и молибденски центар нису директно укључени у ослобађање кисеоника. Редукована ХО може преузети шест електрона у активном делу редок центра, по два за сваки фрагмент. У току оксидације хипоксантина, укључују се четири електрона, док се при оксидацији ксантина врши трансфер два електрона. Све ове промене у ензиму упућују на FAD простетичну групу као место стварања слободних радикала кисеоника (103).

У ин витро и ин vivo условима, XD се може конвертовати у ХО, при чему конверзија може бити реверзибилна или иреверзибилна (104). Реверзибилна конверзија се може извршити: оксидацијом кисеоником, ензимском оксидацијом сулфхидрилних група и хемијском модификацијом тиол група.

Две су групе инхибитора ХО. Једну групу чине аналози пуринских супстрата као алопуринол, оксипуринол, птерин, пиримидин и ароматични хетероциклични алкохол, а другу чине молекули који нису стриктурни аналози и то су цијаниди, арсенати, метанол, формалдехид (101, 105).

Ксантин оксидаза је широко заступљен ензим, међу различитим животињским врстама и у различитим ткивима. Потврђена је улога ХО у у патогенези оштећења многих ткива у стањима исхемије/реперфузије, првенствено миокарда, али и јетре, панкреаса, плућа, бубрега и мозга. Услед хипоксије долази до катаболизма ћелијског АТР до хипоксантина који се нагомилава интрацелуларно, а затим у току реперфузије, ХО може реаговати са хипоксантином и молекулским кисеоником уз стварање суспексид ањона, водоник пероксида и хидроксилног радикала (106). Највећи број истраживања је везан за значај ХО у

кардиоваскуларном систему. Истакнута је улога XO у порасту крвног притиска. Такође, многобројне студије потврђују да је XO извор слободних радикала кисеоника у кардиоваскуларном систему (107, 108). Одређен број истраживања указује на улогу XO у патогенези колитиса, Кронове болести и дуоденалног улкуса.

У одређеним истраживањима је забележено повећање циркулишуће XO у плазми болесника са RA (109) као и присуство XO у синовијској течности инфламраних зглобова RA болесника (110, 111, 112). Такође, показано је да Алопуринол ублажава симптоме артритиса у анималним моделима (109, 113).

У артрисом захваћеном зглобу долази до реоксигенационог оштећења, које прати реперфузију исхемијског ткива. Оштећење кости и хрскавице је посредовано изворима слободних радикала међу којима је и XO. XO продукује реактивне кисеоничне радикале, супероксид анјон и хидроген пероксид. Способност стварања реактивних кисеоничних радикала дефинише ксантин оксидазу као важан патогенетски фактор у исхемијско-реперфузијском оштећењу различитих ткива, укључујући инфламацију зглобова у RA (112).

Постојање анти-XO антитела је потврђено код здраве популације, при чему су IgG анти-XO антитела присутна 1-8% од укупног IgG, док IgM 0,32-1,8 % од укупног IgM. RA се карактерише присуством ауто-антитела тј. реуматоидног фактора (антитела IgM, IgG и IgA). Створени имуни комплекси IgG-RF активирају комплемент а активација комплемента доводи до инфламаторне реакције, деструкције хрскавице и коштане ерозије. XO која је присутна у синовији може бити ослобођена синовијском деструкцијом и на тај начин имати важну улогу у постисхемијској реперфузији синовије, доприносећи карактеристичним знацима и симптомима у артритису (111). Проналажење анти-XO антитела у синовији је битан корак у испитивању могућег механизма оштећења синовије, обзиром да анти-XO антитела у синовијској течности имају протективну улогу. Ова антитела учествују у елиминацији XO из синовијске течности. Висок титар анти-XO антитела у синовијској течности RA болесника је од великог значаја. Као и у серуму, ова антитела су присутна у две форме: као слободна антитела и у оквиру имуних комплекса. Њихова улога је двојака: могу бити укључена у инхибицији XO (позитивна улога) а истовремено могу учествовати у активацији комплемента и у инфламацији (негативна улога) (112).

Проинфламаторни цитокини, али и други медијатори, као што су TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 врше конверзију ендотелне XD у XO независно од исхемије. IFN- γ у вирусним инфекцијама може да доведе до Up-регулације, транскрипције гена за XD/XO (у ендотелним ћелијама, макрофагима, моноклеарним ћелијама) (114). Истовремено се под дејством IFN- γ ослобађа и NO који инхибира XO и смањује оштећења таргет ћелија.

1.9. Значај ензима пуриног циклуса у инфламаторном процесу реуматоидног артритиса

Могућа улога ензима пуриног циклуса у имунодефицирним стањима помиње се од 70-тих година. Значај активности ензима пуриног метаболизма, посебно пурин салваге пута, за нормално функционисање и сазревање имуног система постао је јасан када је откривено да генетски детерминисан дефицит ензима ADA доводи до фаталног исхода у синдрому имунодефицијенције (115).

Ензими пуриног циклуса имају различите улоге у метаболизму многобројних ћелија и ткива, при чему доминира значај ADA у односу на 5'-NT, AMP дезаминазу ксантин оксидазу. ADA је суштински важна за метаболичку функцију многих телесних ћелија, нарочито Т-ћелија. Одсуство овог ензима у организму доводи до акумулације токсичних материја у лимфоцитима а које су нис продукти метаболизма и које последично доводе до смрти ћелија.

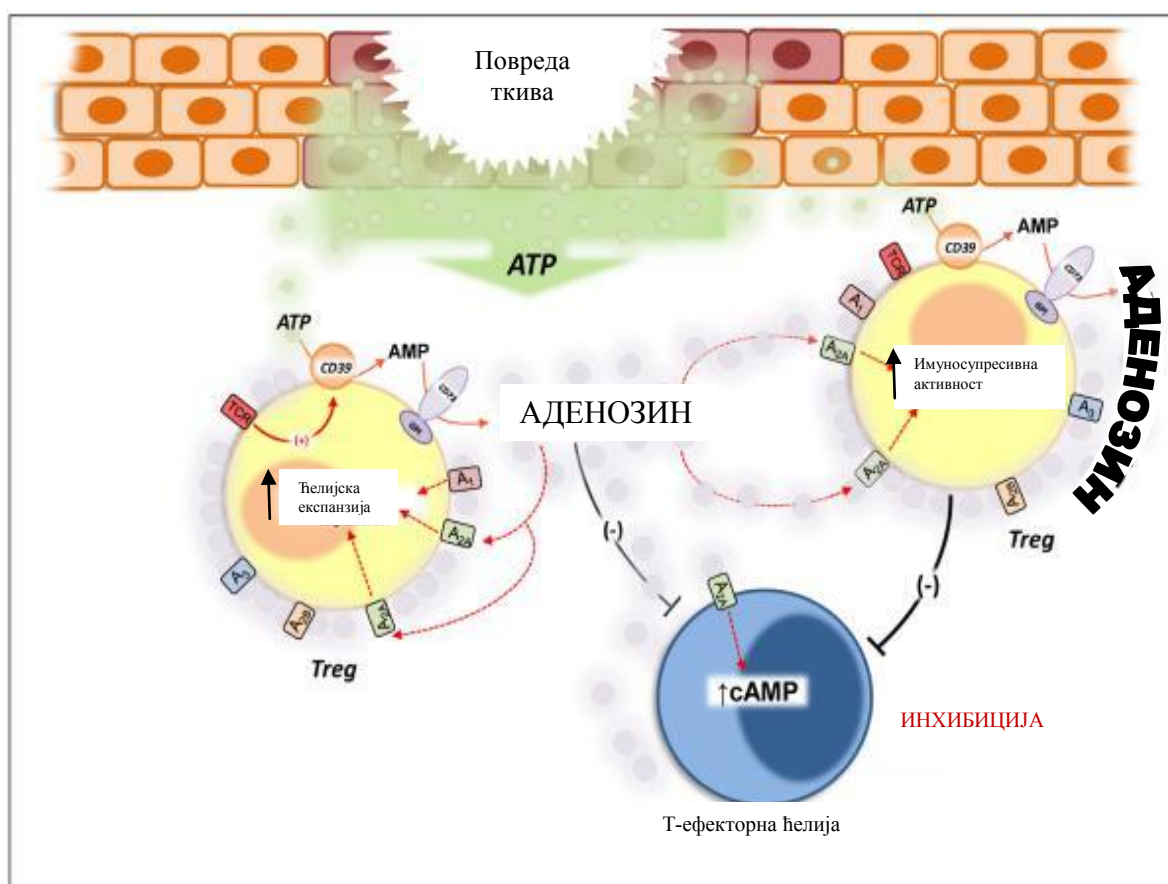
ADA је лиганд CD26 протеина (ADA везујући протеин-ADAbp) при чему у интеракцији са CD26 има стимулативни ефекат на Т ћелијски рецептор (TCR) односно посредује у Т ћелијској активацији (116, 117). Активацијом Т-ћелијског одговора почиње низ реакција које доприносе погоршању запаљења, задебљању синовијалне опне зглобова и разарању хрскавице и кости.

У метаболизму пурина истиче се аденозин као јак имуносупресор и антиинфламаторни метаболит. Он смањује цитотоксичност лимфоцита и инхибира пролиферативни одговор стимулираних лимфоцита (118).

Аденозин спречава отпуштање супероксид ањона и водоник пероксида из стимулираних неутрофила и на тај начин штити даље оштећење ендотела крвних судова (119). Преко својих рецептора утиче на продукцију цитокина и ублажава штетне ефекте проинфламаторних TNF- α и IL-1. Иако ниска концентрација аденозина омогућава хемотаксу полиморфонуклеарних леукоцита и адхезију PMN-а за ендотел, висока концентрација аденозина супримира реактивне кисеоничне продукте PMN-а и покретање леукотријена и инхибира адхезију PMN-а за ендотел (120).

Moncrieffe је са сарадницима (73) приказао високу концентрацију CD39 на CD4⁺ Т ћелијама које су изоловане из синовијске течности пацијената са артритисом. Аутори су пронашли две различите популације ових ћелија: једну која носи Foxp3 (Forkhead box P3) транскрипциони фактор и друге маркере Т регулаторних ћелија и другу популацију ћелија које испољавају меморијски фенотип. Иако Foxp3⁺ ћелије могу да хидролизују АТФ, оне нису

у могућности да супримирају пролиферацију Т ефекторних ћелија. Поред тога, оне ослобађају проинфламаторне цитокине (IL-2, IL-17 и IFN- γ) и највероватније доприносе зглобној инфламацији. Узимајући ово у обзир, CD39⁺CD4⁺ Т Foxp3⁺ и Foxp3⁻ ћелије изоловане из синовије могу да смањују експресију и активност CD73 у поређењу са циркулаторним Т ћелијама, па је закључак аутора да инкомплетно стварање аденозина може допринети зглобној инфламацији.



Слика 8. Значај односа CD39/CD73 у модулатији активности Т регулаторних ћелија-адаптирана слика преузета од Antonioli L и сар.(74)

Однос CD39/CD73 модулира активност Т регулаторних ћелија. Активација Т ћелијског рецептора повећава CD39 активност. Повећање активности АТФ метаболизма је кључно за имуносупресивну активност Т регулаторних ћелија, обзиром да олакшава перичелуларно стварање аденозина, суштинску компоненту имуносупресивне и антиинфламаторне функције Т регулаторних ћелија. Инхибиторна функција створеног аденозина се објашњава активацијом A2A рецептора експримираним на Т ефекторним ћелијама, која смањује имунску активност. Затим, стварање аденозина доводи до сопственог појачавања функције Т регулаторних ћелија обзиром да стимулација A2A рецептора, који се налазе на овим ћелијама, изазива њихову експанзију и повећање њихове имунорегулаторне активности (74).

Генетска истраживања показала су да велики број гена учествује у регулацији продукције хемокина, цитокина као и у експресији активационих или инхибиторних сигнала имунских ћелија које учествују у одржавању инфламације у хроничним артритисима, што за резултат има трајно функционално оштећење комплексне мреже имунорегулације и физиолошке регулације ћелијског циклуса (121). RA је системски инфламаторни поремећај у коме интензитет хроничне инфламације, а самим тим и клиничка слика, зависе од генетске предиспозиције за степен имунске регулације сваког појединца.

Неутрофили имају водећу улогу у одбрани организма од инфекције као и кључну улогу у патогенези многих инфламаторних болести (122). Добро је позната њихова улога ефекторних ћелија у инфламацијом оштећеном ткиву. У току инфламације и оштећења ткива долази до ослобађања аденозина и пораста нивоа аденозина у ткиву (123). Једном активиран аденозин се брзо претвара у инозин посредством аденозин дезаминазе, или фосфорилизацијом уз аденозин киназу до АМР, при чему је полуживот мањи од 10 секунди (124). Неутрофили производе аденозин и могу одговорити свим аденозинским рецепторима. Они су потенцијално највећи извор ткивног аденозина, и аденозин може да стимулише или да инхибише функцију неутрофила у зависности од његове концентрације у микроокружењу и профила рецептора неутрофила.

Наномолекуларне концентрације аденозина преко A1 и A3 рецептора поспешују хемотаксу неутрофила као одговор на инфламацију и фагоцитозу, док микромолекуларне концентрације доводе до активације рецептора мањег афинитета A2A и A2B који инхибирају фагоцитозу и оксидациони стрес, смањују оштећење ћелије, промовишу репарацију и поправак ендотелне баријере (125).

Активирани неутрофили ослобађају бројне цитокине и хемокине као одговор на инфламаторни процес. Активацијом аденозинских рецептора смањује се ослобађање проинфламаторних медијатора из активираних неутрофила, а истовремено се поспешује ослобађање анти-инфламаторних медијатора (126, 127).

Аденозин дезаминаза има важну улогу у регулацији нивоа екстраћелијског аденозина као и у контроли стимулације аденозинских рецептора, што јој даје водећу улогу у модулацији пуринергијског одговора у неколико патофизиолошких догађаја као што су реуматоидни артритис, хронична плућна обољења, сепса и инфламаторне болести црева (128). Нивои ADA у серуму су одраз моноцитно/макрофагне активности у RA. Смањење локалне концентрације аденозина деловањем ADA може бити узрок почетка инфламације у зглобу болесника са RA (129).

2. Циљ истраживања

Имајући на уму значај инфламације у патогенези реуматоидног артритиса и улогу ензима пуринског метаболизма у цитокинској активности циљ рада је:

1. Испитивање активности ензима пуринског метаболизма код болесника са реуматоидним артритисом.
2. Испитивање повезаности тежине клиничког испољавања реуматоидног артритиса са активношћу ензима који учествују у метаболизма пурина.
3. Испитивање повезаности степена инфламације са поремећајима метаболизма пурина.
4. Одређивање степена инфламације код болесника са реуматоидним артритисом и његова повезаност са тежином клиничке слике.

3. Радна хипотеза

Својом улогом у метаболизму пурина и цитокинској активности која је везана за директно стимулативно деловање на њихову секрецију покретањем Th1 одговора, ензими пуриног циклуса имају још увек недовољно јасну улогу у развоју и испољавању реуматоидног артритиса. Због тога је постављена главна хипотеза истраживања:

На: Ензими пуриног циклуса имају значајну патогенетску улогу у настанку и развоју реуматоидног артритиса.

На основу плана истраживања постављене су следеће помоћне хипотезе:

На: Очекује се да постоји значајна повезаност активности ензима пуриног циклуса са тежином клиничког испољавања реуматоидног артритиса и врстом примењене терапије.

На: Претпоставља се да активност ензима укључених у метаболизам нуклеинских киселина и степен инфламације позитивно корелирају са степеном биохемијског и клиничког испољавања реуматоидног артритиса.

4. Болесници и методологија рада

Општи методолошки приступ подразумевао је проспективну анализу анамнестичких, клиничких, радиолошких и лабораторијских показатеља.

Истраживање је извршено у периоду 2011. и 2012. године на Клиници за реуматологију Института за лечење и рехабилитацију "Нишка Бања". Сви испитаници су пре укључивања у истраживање били информисани о циљевима студије, а своју сагласност за учешће потврдили су потписивањем информативног пристанка за учешће у студији. Истраживање је одобрено од стране етичког комитета Института за лечење и рехабилитацију "Нишка Бања" (решење број 03-2508/1). Биохемијска испитивања су реализована у Институту за биомедицину и Институту за биохемију Медицинског факултета у Нишу. Анализа добијених података урађена је на Институту за патофизиологију Медицинског факултетат у Нишу.

4.1. Испитаници

Испитивањем је обухваћено 220 болесника који су подељени у две групе:

I група -обухвата 160 болесника оба пола са дијагнозом реуматоидног артритиса.

Ова група болесника је подељена у две подгрупе:

Иа-подгрупа (рани RA)- обухвата болеснике код којих болест траје најдуже дванаест месеци и код којих још увек није започета терапија болест модификујућим лековима-60 болесника

Па-подгрупа (касни или прогресивни RA)- обухвата болеснике код којих болест траје дуже од дванаест месеци -100 болесника.

Из ове групе болесника је издвојена подгрупа болесника који су у периоду истраживања били на терапији болест модификујућим леком - Метотрексатом (Methotrexat®), тако да је у групи са касним RA и примењеном терапијом метотрексатом било 67 болесника, а у групи са касним RA без метотрексата било је 33 болесника.

II група (контролна)- обухвата 60 болесника са дегенеративним обољењем кичменог стуба (цервикални синдром, лумбални синдром или оба) без клиничких и лабораторијских показатеља за присуство реуматоидног артритиса.

Критеријуми за постављање дијагнозе RA су: јутарња укоченост, артритис 3 или више зглобних подручја, артритис руку, симетрични артритис, реуматоидни чворићи, позитиван реуматоидни фактор и радиолошке промене. Дијагноза RA се поставља ако је 4 од ових 7 критеријума присутно, при чему промене из критеријума 1-4 треба да трају најмање 6 недеља (130).

Болесници са акутним и хроничним инфламаторним обољењима (болести везивног ткива, друге системске болести), хроничном респираторном, срчаном и бубрежном инсуфицијенцијом, тежим акутним обољењима, и другим болестима од значаја које би могле да модификују инфламаторни одговор су искључени из истраживања.

4.2. Методологија

Анамнестички подаци су узети од свих болесника.

Клиничка обрада болесника подразумевала је:

- физикални преглед
- процену функцијске способности болесника попуњавањем HAQ упитника
- процену активности болести помоћу DAS28 скале

Физикалним прегледом локомоторног апарата су анализирани: број палпаторно осетљивих зглобова и број отечених зглобова, трајање јутарње укочености зглобова у минутима, замор.

Субјективна процена бола је одређена уз помоћ VAS (visual analog scale of pain) – 100mm скала на којој болесници сами одређују степен бола од 0 до 100, при чему је 0 безболност а 100 максимум бола.

Процена замора болесника вршена је коришћењем хоризонталне визуелне скале замора од 0 до 10, при чему је исказ без замора индексан са нулом а изражен замор десетком.

Функцијска способност болесника је одређена на основу упитника процене здравственог стања-Health Assessment Questionnaire (HAQ), који попуњава сам болесник. Овај упитник се састоји од двадесет питања сврстаних у 8 категорија које се односе на различите животне активности: облачење, лична хигијена, устајање, исхрана, ходање, дохватање предмета, хватање, активности.

Болесници имају избор од четири одговора на свако постављено питање са бодовањем сваког одговора од 0 до 3 при чему је:

- 0- изводљиво без проблема
- 1- изводљиво са мало потешкоћа
- 2- изводљиво са много потешкоћа
- 3- неизводљиво

Одговор који је највише бодован у једној категорији питања се користи за дату функцију. На основу одговора болесника одређује се HAQ индекс који представља количник збира највиших бодова у групама питања и број категорија тј. 8. HAQ скор је у границама од 0 до 3, при чему веће вредности HAQ скорa указују на веће функцијско ограничење.

HAQ индекс има три градације: умерена неспособност (лако смањење функција свакодневног живота) је индексирана оценом од 0 до 1, оцена 1,01 до 2 указује на тежу неспособност (озбиљније функцијско оштећење), а оцена 2,01 до 3 потпуну физичку неспособност уз неопходност пружања туђе помоћи (131).

У циљу одређивања активности болести коришћен је DAS 28-disease activity score. Ово је комбиновани индекс којим је обухваћена палпаторна осетљивост и оток 28 зглобова (рамена, лактови, зглобови ручја, метакарпо-фалангеални зглобови, проксимални-интерфалангеални зглобови и колена), брзина седиментације и процена активности болести од стране испитаника. DAS 28 скор је број на скали од 0 до 10 који показује тренутну активност болести. Ниво активности болести се интерпретира као низак ако је $DAS\ 28 \leq 3,2$, као умерена активност ако је $3,2 < DAS\ 28 \leq 5,1$ или као висока активност болести када је $DAS\ 28 > 5,1$. Уколико је $DAS\ 28 < 2,6$ сматра се да је болест у ремисији (132).

Радиолошка испитивања

У циљу сагледавања присутности и степена оштећења зглобова, свим болесницима је урађена стандардна радиографија шака и стопала у постериорно-антериорној пројекцији.

На основу радиографија шака и стопала одређен је анатомски стадијум болести по Stenbrocker-у од I до IV (133), и то на следећи начин:

- I стадијум-периартикуларни оток меких ткива, јукстаартикуларна остеопороза
- II стадијум- сужење зглобног простора, субкортикалне цисте, почетене ерозивне промене
- III стадијум-изражене ерозије зглобних простора, сублуксације
- IV стадијум-анкилоза

Лабораторијска обрада болесника

Код свих болесника, крв за лабораторијске анализе је узимана из кубиталне вене у јутарњим часовима наште (период гладовања од 12 сати), у хепаринизираним вакуум епруветама. Крв је затим обрађивана у општој лабораторији стандардним методама, а из добијених узорка су одређени:

Параметри крвне слике:

- концентрација хемоглобина (Hb) изражена у g/L, референтне вредности лабораторије (110-165 g/L)
- број Ег изражаван у T/L референтне вредности лабораторије (3,5-6,0 T/L)
- број Тг изражаван у G/L референтне вредности лабораторије (110-410 G/L)
- број Ле изражаван у G/L референтне вредности лабораторије (4,0-10,0 G/L)
- релативна леукоцитарна формула (% лимфоцита, % моноцита, % базофила, % неутрофила, % еозинофила) изражена у % заступљености у односу на укупан број леукоцита у периферној крви
- брзина седиментације еритроцита у првом сату одређивана је методом по Westergreen-у и изражавана у mm/h.

Биохемијски патраметри:

- концентрација C-реактивног протеина (CRP) одређивана је стандардним лабораторијским методама на анализатору Latex slide аглутинацијским тестом (Huma Tex CRP-Germany) и изражавана је у mg/L
- присуство и концентрација IgM RF одређивано је методом латек аглутинације (Huma Tex RF-Germany). Позитивним су сматрани резултати са концентрацијом RF већом од 20 IU/mL.
- фибриноген је одређиван турбидиметријском методом и вредности изражаване у g/L. Нормалне вредности су 2,0-4,0 g/L
- јутарња гликемија је изражавана у mmol/L, а нормалне вредности лабораторије су 4,1-6,4 mmol/L
- уреа је изражавана у mmol/L, при чему су нормалне вредности лабораторије 1,7-8,3 mmol/L

- креатинин је изражаван у $\mu\text{mol/L}$, при чему су нормалне вредности лабораторије за креатинин 55-120 $\mu\text{mol/L}$
- мокраћна киселина је изражавана у $\mu\text{mol/L}$, а нормалне вредности лабораторије су 140-420 $\mu\text{mol/L}$
- креатин киназа (СК) је изражавана у U/L, а нормалне вредности лабораторије су 27-200 U/L
- активност аспартат аминотрансферазе (AST) је одређивана UV кинетичком модификованом методом на аналајзеру. Референтне вредности: <37 (М) U/L и <31 (Ж) U/L.
- активност аланин аминотрансферазе (ALT) је одређивана UV кинетичком модификованом методом на аналајзеру. Референтне вредности: <40 (М) U/L и <31 (Ж) U/L

Активност 5'-нуклеотидазе је одређивана спектрофотометријски по методи Wood-а и Williams-а (1981). Метода је базирана на одређивању ослобођеног неорганског фосфора из супстрата AMP-а. Аликвот од 0,5ml серума је инкубиран 30 минута на 37° у присуству барбитуратног пуфера pH=7,8, при чему је као активатор коришћен манган, а као супстрат 10 μmol Na-AMP. Након додавања хидразин сулфат-калај хлорног раствора и амонијум-молибдата, ослобођени неоргански фосфор је одређиван спектрофотометријски на 618nm (134).

За одређивање активности аденозин дезаминазе у серуму коришћен је аденозин дезаминаза есеј кит фирме Diazyme. Одређивање ADA је базирано на ензимској деаминацији аденозина у инозин, који конвертује у хипоксантин уз помоћ пурин нуклеозид фосфорилазе. Хипоксантин се затим конвертује у мокраћну киселину и водоник пероксид уз помоћ ксантин оксидазе. Једна јединица ADA је дефинисана као количина ензима потребна за отпуштање 1 $\mu\text{mol/min}$ инозина из аденозина на 37°C. Активност аденозин дезаминазе је изражена у јединицама по литру.

AMP дезаминаза је одређивана по методи Pederson-а и Berry-а (135). Овом методом ослобођени амонијак је мерен у присуству алкалног раствора салицилат/нитропрусида.

Активност ксантин оксидазе (ХО) је одређивана спектрофотометријски, UV тестом по методи Kizaki-а и Sakurada (136) мерењем концентрације мокраћне киселине која се ослободи из супстрата ксантина. Аликвот од 0,1ml серума је додаван 1ml TRIS-HCL пуфера pH=7,8 у концентрацији од 0,1mol/L и 1ml ксантина у концентрацији 0,1mmol/L. Након инкубације од 30 минута на 37° реакција је прекидана и протеини прецитипирани додавањем 0,1ml перхлорне киселине. Свака анализа је имала своју слепу пробу којој је након

депротеинизације са перхлорном киселином и 15-минутне инкубације на леду додаван 1ml супстрата ксантина у концентрацији од 0,1mmol/L. Након центрифугирања 10 минута на 5000 обртаја, апсорбанца свих узорка је мерена спектрофотометријски на 293nm.

Статистичка обрада података

Подаци су обрађени коришћењем стандардних дескриптивних статистичких метода (средња вредност, стандардна девијација и процентуална заступљеност). Резултате смо анализирали употребом одговарајућих тестова:

- Student-ов т тест за упарене и неупарене узорке
- H_i^2 тест
- Fisher-ов тест егзактне вероватноће
- Pearson-ов коефицијент линеарне корелације
- Wilcoxon-ов тест еквивалентних парова
- Somers'd дирекционално ординални тест
- Модел бинарне логистичке регресије
- Kaplan Meier анализа кумулативног ризика

Статистичка обрада је урађена програмима Excel 7.0 и SPSS 11.0 у Windows 98 окружењу, при чему су резултати приказани табеларно и графички.

5. Резултати

5.1. Опште карактеристике испитиваних група

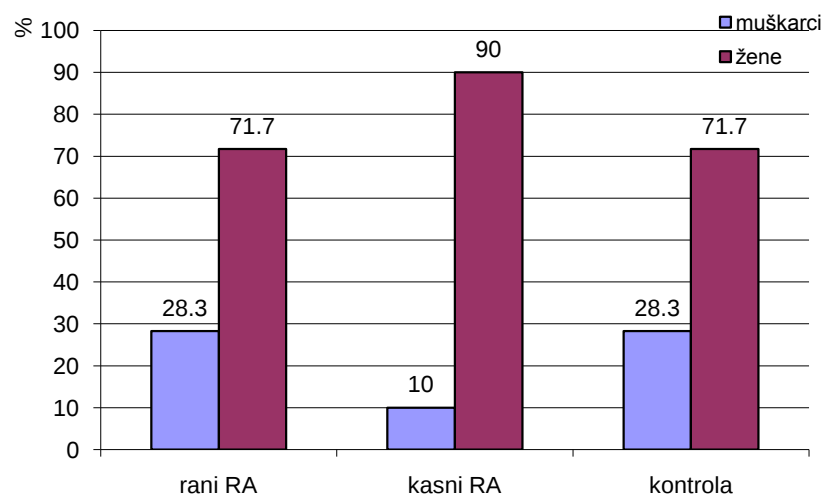
Укупно је укључено 220 болесника од којих је 160 са RA и 60 у контролној групи. Рани RA имало је 60, а касни RA 100 болесника. Полна заступљеност и просечна старост болесника у испитиваним групама дата је у Табели 2.

Табела 2. Карактеристике формираних група болесника

група	рани RA	касни RA	контрола	укупно
мушкарци	17 / 28.3	10 / 10.0	17 / 28.3	44 / 20.0
жене	43 / 71.7	90 / 90.0	43 / 71.7	176 / 80.0
старост	58.6±12.9 (51.9-61.7)	59.8±11.8* (56.7-62.8)	49.8±18.0 (39.4-60.2)	57.6±13.4 (54.9-60.2)

Подаци су приказани као $n / \%$ или као средња вредност $\pm$ SD (95% CI for mean), $H_i=5.3$; NS између група; *ANOVA $F=3.3$, $p<0.05$ наспрам контрола

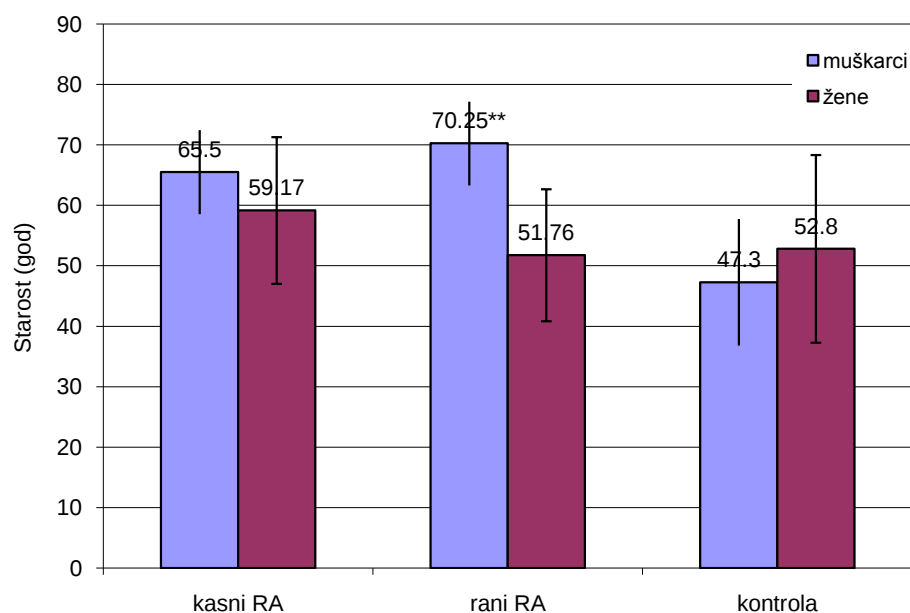
Урађена статистичка анализа показује да су болесници са касним RA значајно старији од болесника у контролној групи ($p<0.05$). Ова разлика у просечној старости није регистрована између болесника са раним RA и контроле. Урађена анализа Chi квадрат тестом није показала значајније разлике у полној дистрибуцији болесника између испитиваних група (Табела 2 и Графикон 1)



NS између група

Графикон 1. Пропорција болесника по групама у односу на пол

Просечна старост болесника у односу на пол у испитиваним групама приказана је на Графикону 2.

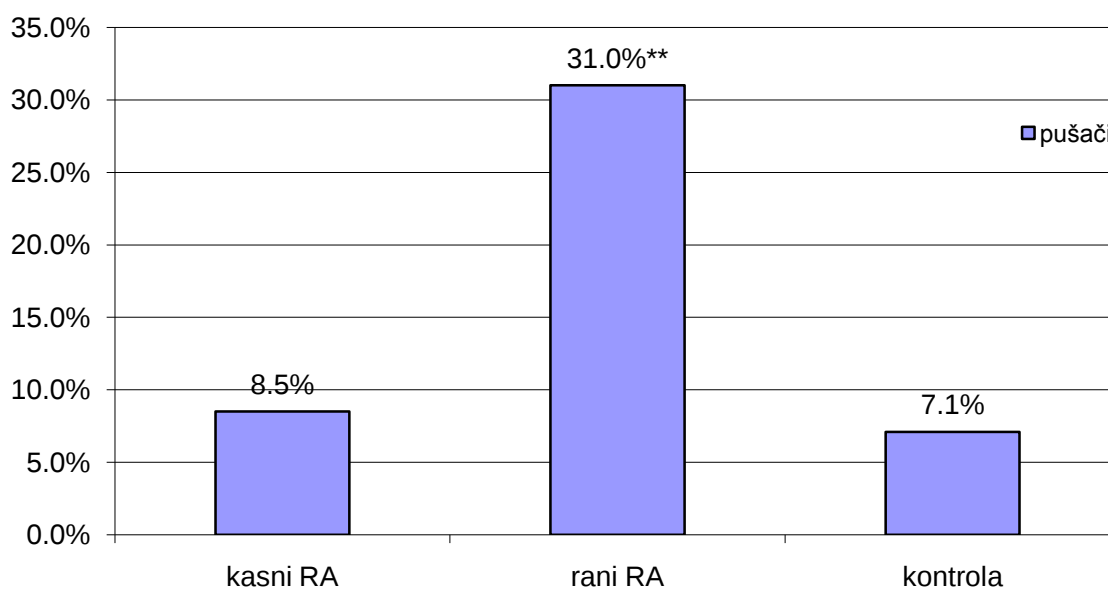


Графикон 2. Просечна старост болесника у односу на пол у испитиваним групама

Урађена статистичка обрада Студентовим t тестом је показала постојање значајније разлике у старости између полова у групи болесника са раним RA. У овој групи мушкарци су

били значајно старији од жена. Сличне разлике нису нађене у осталим групама болесника (Графикон 2).

Присуство навике пушења код испитиваних група болесника приказана је на Графикону 3.



**p<0.01 наспрам остале групе

Графикон 3. Учесталост пушења у испитиваним групама болесника

Урађена анализа Kruskal Wallis тестом показује да постоји значајна разлика у заступљености пушења између испитиваних група болесника ($H=8.54$, $p<0.01$). Урађени Ман У тест показује да су болесници са раним RA знатно чешће пушачи од болесника са касним RA и контроле ($p<0.01$) (Графикон 3).

Просечно трајање болести приказано је у Табели 3.

Табела 3. Просечно трајање болести

трајање болести (месеци)	рани RA	касни RA	контрола	ANOVA
X±SD	11.5±7.2**	124.4±81.0	111.4±64.9	F=28.3 p<0.01
95% CI for mean	(9.7-12.1)	(103.3-145.6)	(73.9-148.9)	

Подаци су приказани као средња вредност±SD (95% CI for mean), ANOVA и post hoc анализа Tuckey HSD тест; **p<0.01 наспрам остале групе

5.2. Клиничке карактеристике болести

Клиничке карактеристике испитиваних група болесника обухватиле су одређивање замора, болност и отеченост зглобова, присуство реуматоидних чворића и трајање јутарње укочености, као и VAS, DAS28 скор и индекс HAQ. Присуство замора и јутарње укочености код испитиваних болесника приказано је у Табели 4.

Табела 4. Присуство замора код испитиваних група болесника

	рани RA	касни RA	контрола	укупно
замор	12 / 20.0**	58 / 58.0**	5 / 7.3	75 / 34.1
Укупно	60 / 100.0	100 / 100.0	60 / 100.0	220 / 100.0

Подаци су приказани као $n / \%$, $H_{12}=18.4$, $p<0.01$ између група, Mann-Whitney U тест** $p<0.01$ наспрам остале групе, * $p<0.05$ наспрам контрола

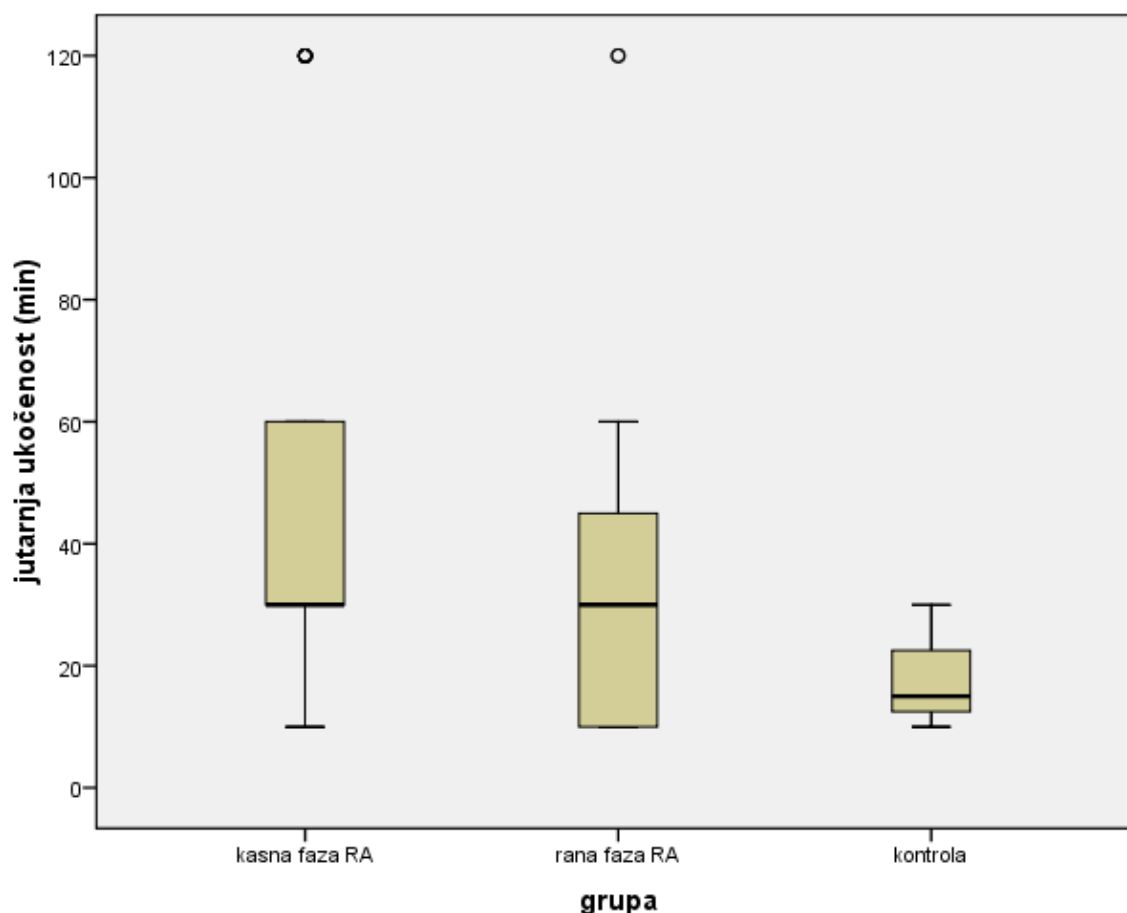
Урађена статистичка анализа Kruskal Wallis тестом показује да постоји значајна разлика у појави замора између испитиваних група болесника ($H_1=18.23$, $p<0.001$). Замор је чешће присутан код болесника са касним RA (58%) у односу на рани RA, док се у контролној групи болесника са дегенеративним реуматизмом најређе јављао (7.3%) ($p<0.01$) (Табела 4).

Трајање јутарње укочености приказано је у Табели 5 и на бокс-плоту Графикон 4.

Табела 5. Трајање јутарње укочености

	рани RA	касни RA	контрола
јутарња укоченост (мин)	36.5±32.4 (17.4-55.9)	49.4±38.2* (38.2-60.6)	18.3±10.4 (7.5-40.1)

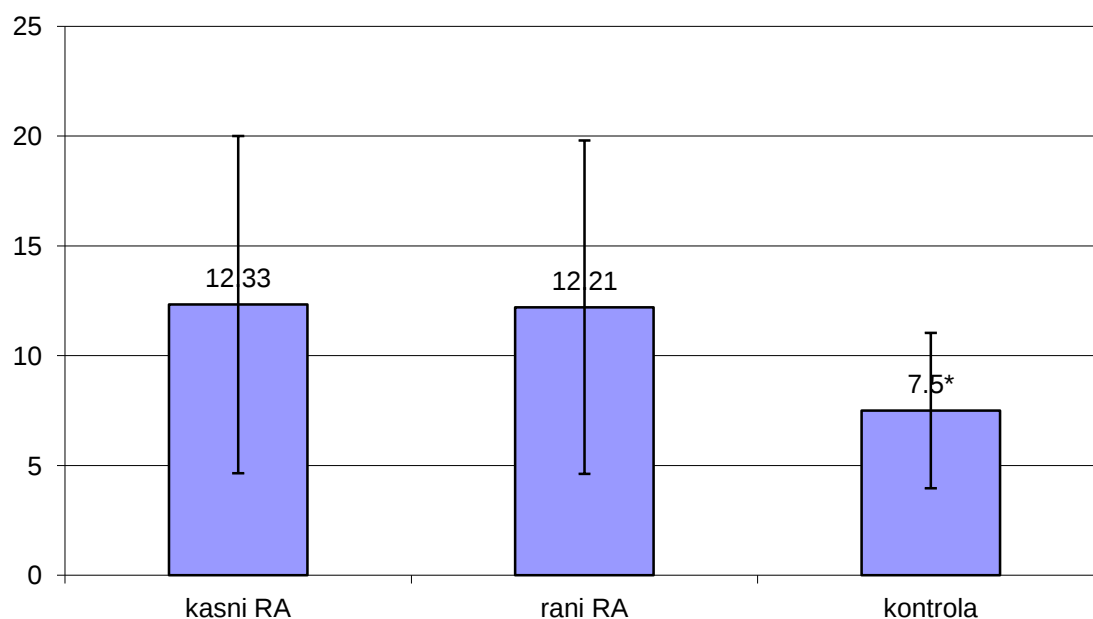
Подаци су приказани као средња вредност±SD и као (95% CI за средњу вредност), Mann-Whitney U test, * $p<0.05$ наспрам контрола



Графикон 4. Боксплот приказ: Трајање јутарње укочености. Боксплотови показују интерквартилни опсег (25-75. перцентил), централна линија медијану, +/- барови минималну и максималну вредност, О-Outliers вредности које се налазе 1.5-3 интерквартилна опсега удаљене од медијане

Урађена анализа показује да болесници са касним RA имају значајно дуже трајање јутарње укочености од контролних испитаника, док просечно трајање јутарње укочености се није значајније разликовало код болесника са RA без обзира на фазу болести (Табела 5, Графикон 4).

У групи са касним RA 86% болесника је имало палпаторну осетљивост зглобова. У групи са раним RA овај проценат је износио 96%, а у контролној групи регистровано је 15% болесника са палпаторном осетљивошћу зглобова. Просечан број палпаторно осетљивих зглобова код испитиваних болесника приказан је на Графикону 5.



Подаци су приказани као средња вредност $\pm$ SD, * $p<0.05$ наспрам остале групе

Графикон 5. Просечан број палпаторно осетљивих зглобова

Просечан број палпаторно осетљивих зглобова код болесника са касним и раним RA (12.3 ± 7.6 и 12.2 ± 7.5 проспективно) је био значајно већи у односу на контролу (7.5 ± 3.5) ($p<0.05$) (Графикон 5).

У групи са касним RA 70% болесника је имало отеченост зглобова. У групи са раним RA овај проценат је износио 72%, а у контролној групи нису регистровани болесници са отоком зглобова. Просечан број отечених зглобова код испитиваних болесника приказан је у Табели 6.

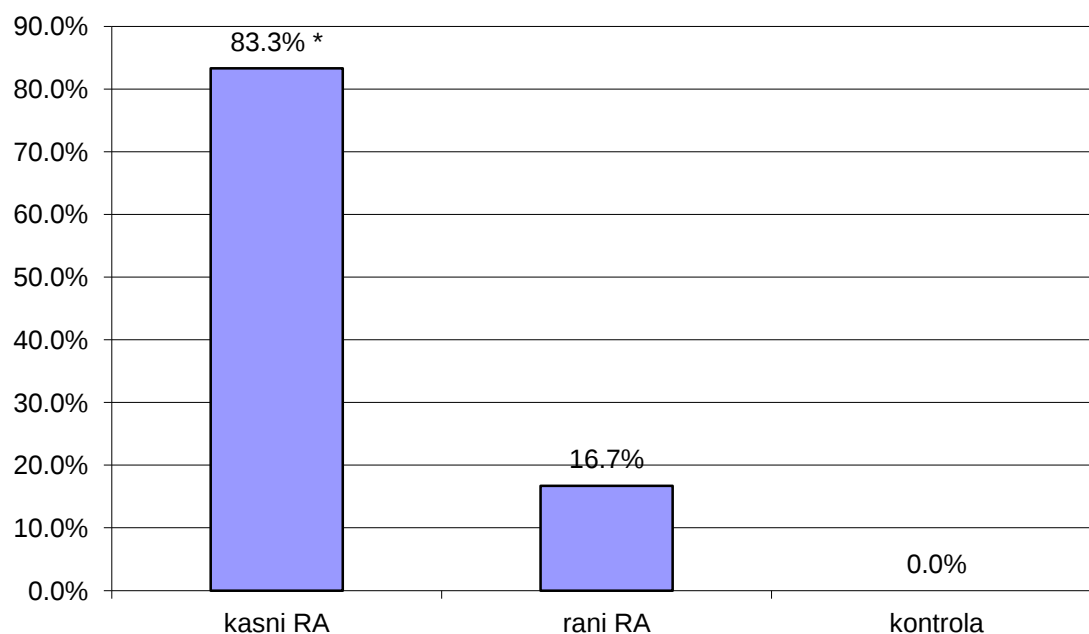
Табела 6. Просечан број отечених зглобова

	рани RA	касни RA	контрола
отечени зглобови	4.1 ± 3.0 (2.6-5.5)	3.2 ± 2.0 (2.6-3.9)	-

Подаци су приказани као средња вредност $\pm$ SD и као (95% CI за средњу вредност), Манн-Whitney U тест, NS између група

Урађена анализа није показала значајније разлике у броју отечених зглобова код болесника са RA без обзира на фазу болести (Табела 6).

Присуство реуматоидних чворића код испитиваних болесника приказано је на Графикону 6.



Подаци су приказани у виду процентуалне заступљености, * $p < 0.05$ наспрам рани RA

Графикон 6. Пропорција болесника са реуматоидним чворићима

Урађена анализа показала је да код болесника са касним RA постоји значајно већа пропорција болесника са реуматоидним чворићима у односу на болеснике са раним RA (Mantzel Haencel $H_i=4.5$, $p < 0.05$). Присуство реуматоидних чворића није регистровано код болесника у контролној групи (Графикон 6).

Просечни скор DAS28, вредности VAS и индекса HAQ приказане су у Табели 7.

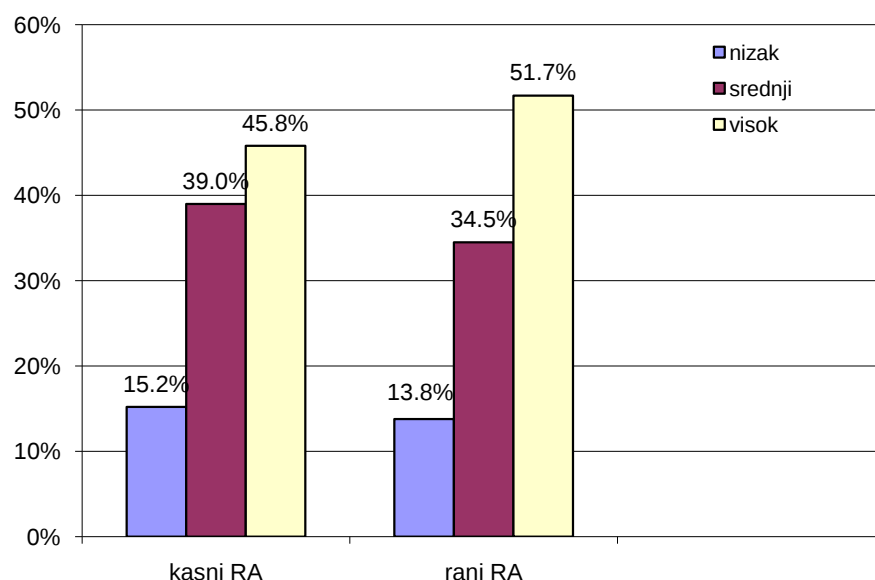
Табела 7. Вредности DAS28 скорa, VAS бола и индекса HAQ

		N	X±SD	95% Confidence interval for mean	Минимум м	Максимум ум
DAS28 скор	касни RA	100	4.66±1.4	4.27-5.05	0.38	7.32
	рани RA	60	5.11±1.3	4.50-5.52	2.50	7.32
	контрола	60	-	-	-	-
	Укупно	220	4.38±1.7	4.04-4.72	0.38	7.32
VAS	касни RA	100	40.02±22.7	34.08-45.95	0	82
	рани RA	60	32.86±19.9	25.27-40.45	0	69
	контрола	60	17.00±16.5**	7.44-26.56	0	50
	Укупно	220	34.82±22.4	30.41-39.24	0	82
Индекс HAQ	касни RA	100	0.99±0.6	0.82-1.16	0	2.37
	рани RA	60	0.63±0.5&&	0.41-0.84	0	1.97
	контрола	60	0.24±0.3**	0.03-0.45	0	1.37
	Укупно	220	0.78±0.64	0.66-0.91	0	2.37

DAS28-Disease activity scor, VAS-Visual analog scale, HAQ-Health assessment questionnaire;

**p<0.01 наспрам група са раним и касним RA, &&p<0.01 наспрам касни RA (Mann-Whitney U тест)

Урађена анализа показала је да контролна група болесника има значајно мању просечну вредност VAS у односу на групе болесника са RA (p<0.01), али и да између група болесника са RA нема разлике у овим вредностима без обзира на фазу болести. Функцијска способност мерена индексом HAQ се значајно разликује између свих испитиваних група болесника. (Табела 7).

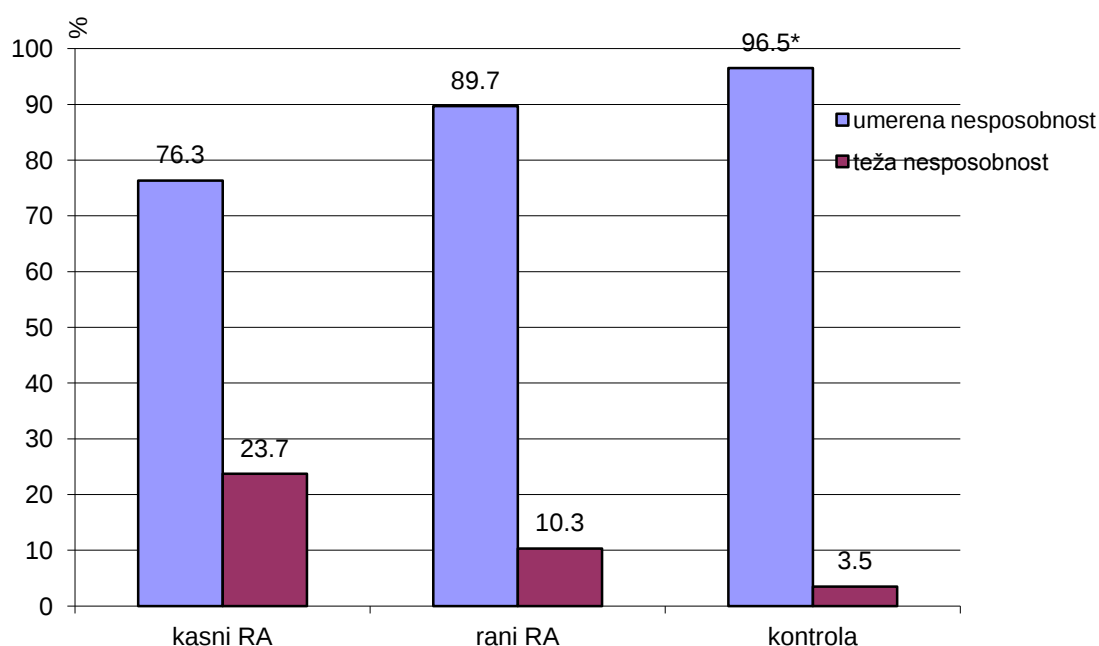


****p<0.01** наспрам групе са RA

Графикон 7. Ниво активности болести процењен на основу DAS28 скале

Између болесника са раним и касним RA не постоји статистички значајна разлика у нивоу активности болести процењене на основу индекса DAS28. Међутим, нумеричке вредности показују да вредност DAS28 скорa у раном RA износи 5,11 што указује на високу активност болести, док је у групи са касним RA просечни DAS28 скор 4,66 што указује на умерену активност болести (Графикон 7).

Функцијска способност болесника одређена уз помоћ индекса HAQ приказана је на Графикону 8.

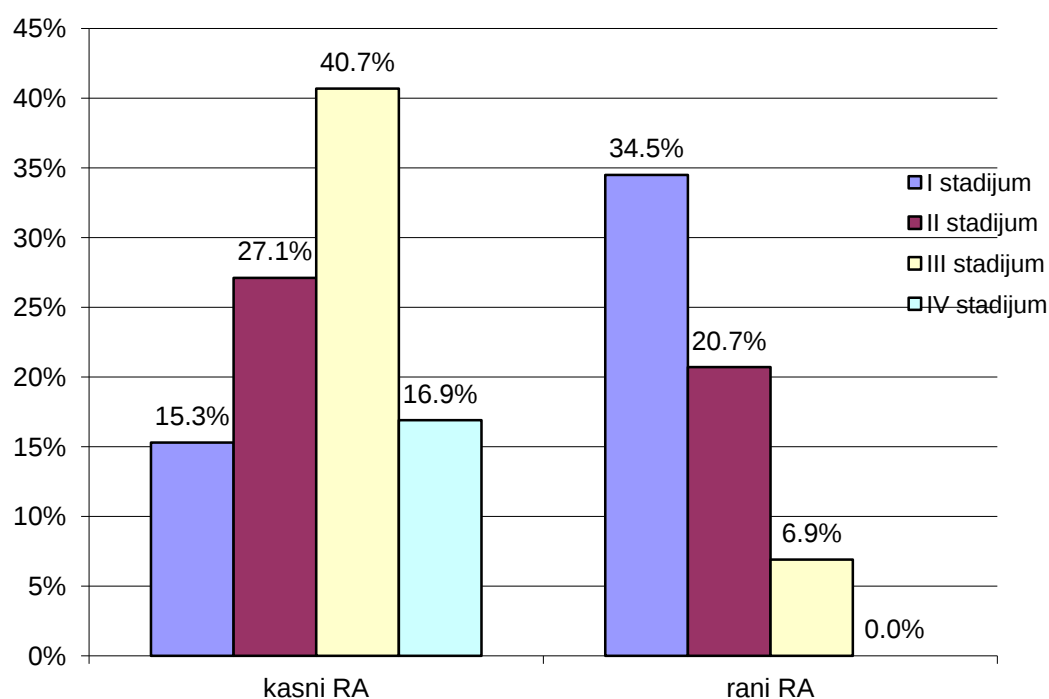


* $p < 0.05$ наспрам касног RA

Графикон 8. Функцијска способност болесника (индекс HAQ)

Тежа неспособност за обављање свакодневних послова је најчешћи налаз (23.7%) у групи са касним RA у односу на остале испитиване групе ($p < 0.05$), док је у групи са раним (10.3%) и контролној групи (3.5%) приближно слично заступљен налаз (Графикон 8).

Анатомски стадијум болести по Stenbrocker-у одређен на основу радиографија шака и стопала приказан је на Графикону 9.



$H_i2=38.4$, $**p<0.01$ између група

Графикон 9. Анатомски стадијум болести по Stenbrocker-у

Учињена анализа потврдила је постојање значајне разлике у дистрибуцији тежине анатомских стадијума болести по Stenbrocker-у ($H_i2=38.4$, $p<0.01$) између група болесника са RA.

Лакши стадијуми су били знатно чешћи налаз код болесника са раним RA, а тежи стадијуми код болесника са касним RA (Графикон 9).

5.3. Лабораторијски параметри испитиваних група болесника

Лабораторијски параметри крвне слике и леукоцитарна формула приказани су у Табели 8.

Табела 8. Параметри крвне слике

	рани RA	касни RA	контрола
SE (mm/h)	35.8±27.8	29.9±20.1	13.6±14.3**
Hb (mmol/l)	132.4±13.1	131.0±11.9	141.0±7.8**
Er (T/L)	4.39±0.4	4.38±0.4	4.88±0.3**
Tr (G/L)	286.3±73.9	272.6±78.8	264.5±46.9
Le (G/L)	7.51±1.80*	7.09±2.3	6.04±1.34
Ly (%)	34.84±7.6	32.24±10.4	36.00±6.3
Mid (%)	4.14±1.1	5.09±4.5	4.78±1.2
Grn (%)	62.31±9.3	62.26±9.6	59.45±7.5

SE-брзина седиментације у I сату, Hb-концентрација хемоглобина, Er-број еритроцита, Tr-број тромбоцита, Le-број леукоцита, Ly-проценат лимфоцита, Mid-проценат интремедијарних ћелија, Grn-проценат гранулоцита, Подаци су приказани као средња вредност±SD; ANOVA и post-hoc Dunnett T3 тест: **p<0.01 наспрам остале групе, *p<0.05 наспрам контрола

Урађена анализа показује да је брзина седиментације значајно мања у контроли него у групама са RA (p<0.01). Уједно концентрација хемоглобина и број еритроцита су значајно већи у контроли него у групама са RA (p<0.01). Од осталих испитиваних параметара крвне слике једино је број леукоцита био значајно већи у групи са раним RA у односу на остале групе (p<0.05) (Табела 8).

Лабораторијски параметри инфламације приказани су у Табели 9.

Табела 9. Параметри инфламације

	рани RA	касни RA	контрола
фибриноген (g/L)	4.02±0.6	4.17±0.5*	3.68±0.5
RF позитивно	35	72	-
CRP (mg/L)	29.79±23.8	24.41±21.4	5.2±2.8**

RF-реуматоидни фактор, CRP-С реактивни протеин

Подаци су приказани као средња вредност±SD; ANOVA и post-hoc Dunnett T3 тест: **p<0.01 наспрам остале групе, *p<0.05 наспрам контрола

Вредности фибриногена код болесника са касним RA су значајно веће у односу на остале групе ($p < 0.01$). Вредности CRP су значајно веће у обе групе са RA у односу на контролу ($p < 0.01$) (Табела 9).

Вредности стандардних ензимских анализа целуларног оштећења приказане су у Табели 10.

Табела 10. Вредности биохемијских параметара целуларног оштећења

	рани RA	касни RA	контрола
CPK (U/L)	71.5±40.5	85.1±33.6	135.2±84.2
AST (U/L)	33.6±6.6	34.7±12.2	30.8±10.4
ALT (U/L)	28.2±8.3	26.1±11.3	25.7±8.1

CPK-креатинин фосфо киназа, AST-аспартат аминотрансфераза, ALT-аланин аминотрансфераза; Подаци су приказани као средња вредност±SD; ANOVA и post-hoc Dunnett T3 тест: NS за све параметре

Испитивање је показало да не постоје значајније разлике у просечним вредностима лабораторијских параметара (CPK, AST, ALT) у односу на присуство и фазу RA (Табела 10).

Табела 11. Вредности маркера метаболичке контроле

	рани RA	касни RA	контрола
глукоза (mmol/L)	5.0±0.8	5.1±1.0	5.5±1.6
уреа (mmol/L)	6.4±2.5	5.9±1.4	5.2±1.0
креатинин (μmol/L)	79.3±17.0	77.0±14.5	76.1±13.7
мокраћна киселина (μmol/L)	270.0±90.1	250.2±55.6	244.7±69.9

Подаци су приказани као средња вредност±SD; ANOVA и post-hoc Dunnett T3 тест: NS за све параметре

Анализа је показала да не постоје значајније разлике у просечним вредностима маркера метаболичке контроле (глукоза и азотни продукти) у односу на присуство и фазу RA (Табела 11).

5.4. Активност ензима укључених у метаболизам пурина

Вредности ензима укључених у метаболизам пурина у испитиваним групама приказане су у Табели 12.

Табела 12. Активност ензима укључених у метаболизам пурина у испитиваним групама

група	рани RA	касни RA	контрола	укупно
5' -нуклеотидаза (U/L) F=51.9; p<0.01	14.63±2.71 (23.1-54.1)	18.95±9.99** (167.5-214.4)	15.05±1.25 (20.0-67.6)	16.21±4.65 (106.9-147.9)
АМР дезаминаза(U/L) F=0.54; NS	1.49±0.48 (1.30-1.67)	1.46±0.29 (1.39-1.54)	1.36±0.42 (1.11-1.61)	1.46±0.37 (1.38-1.53)
Ксантин оксидаза (U/L) F=27.9; p<0.01	0.05±0.04 (0.03-0.06)	0.20±0.12** (0.17-0.23)	0.05±0.04 (0.02-0.09)	0.13±0.12 (0.11-0.16)

Подаци су приказани као средња вредност±SD и (95% CI за средњу вредност), ANOVA и post-hoc Dunnett T3 тест: **p<0.01 наспрам остале групе

Активност 5'-нуклеотидазе и ксантин оксидазе су значајно различите у испитиваним групама болесника. Post Нос анализа (Dunnett T3 test) је показала да је активност 5'-NT највећа у групи са касним RA, док се није значајније разликовала између група са раним RA и контроле (p<0.01). Активност ксантин оксидазе је такође највећа у групи са касним RA док је у групама са раним RA и контроли била приближно слична (p<0.01) (Табела 12).

Вредности аденозин дезаминазе у испитиваним групама болесника приказане су у Табели 13.

Табела 13. Вредности ADA у испитиваним групама болесника

	N	ADA (U/L) X±SD	95% Confidence Interval for Mean	Минимум	Максимум
касни RA	100	13.05±6.58***	11.33-14.76	6.00	32.09
рани RA	60	20.42±5.43***	18.35-22.49	10.10	30.27
контрола	60	6.19±1.62***	5.25-7.13	4.12	9.54
укупно	220	14.20±7.36	12.76-15.65	4.12	32.09

Анализа варијансе (F=30.63, p<0.001), Post Нос-***p<0.001 vs остале групе

Вредности ADA су значајно различите у испитиваним групама болесника. Post Hoc анализа (Dunnett T3 тест) је показала да су вредности ADA у контроли значајно мање у односу на групе болесника са RA ($p < 0.001$), при чему је и вредност ADA у групи са касним RA значајно мања у односу на групу са раним RA ($p < 0.001$) (Табела 13).

5.5. Тежина клиничког испољавања реуматоидног артритиса и активност ензима пуриног циклуса

Повезаност тежине клиничког испољавања реуматоидног артритиса са активношћу ензима који учествују у метаболизму пурина анализирана је биваријантним корелационим анализом (Spearman корелациони коефицијент- r за номиналне и ординалне податке и Pearson корелациони коефицијент- r за континуиране нумеричке податке).

Корелација параметара тежине клиничког испољавања RA и активности ензима укључених у метаболизам пурина код болесника са касним RA приказан је у Табели 14.

Табела 14. Корелација клиничких показатеља са активношћу ензима у касном реуматоидном артритису

Pearson/Spearman Correlation	Ксантин оксидаза	5'-нуклеотидаза	АМРдезам иназа	Аденозин дезаминаза
DAS28 (C)	-0.068	0.128	-0.311*	0.170
VAS (C)	-0.007	0.135	-0.227	0.084
HAQ (C)	0.000	0.085	-0.137	-0.094

DAS28-Disease activity scor, VAS-Visual analog scale, HAQ-Health assessment questionnaire;

* $p < 0.05$

Активност болести код болесника са касним RA, одређена DAS28 скором показује слабу али значајну негативну повезаност са вредностима АМР дезаминазе ($C = -0.31$, $r = -0.29$; $p < 0.05$) (Табела 14).

Корелација параметара тежине клиничког испољавања RA и активности ензима укључених у метаболизам пурина код болесника са раним RA приказан је у Табели 15.

Табела 15. Корелација клиничких показатеља са активношћу ензима у раном реуматоидном артритису

Pearson/Spearman Correlation	Ксантин оксидаза	5'-нуклеотидаза	АМРдезам иназа	Аденозин дезаминаза
DAS28 (C)	0.111	0.108	-0.091	-0.115
VAS (C)	0.073	0.151	-0.056	0.184
HAQ (C)	0.250	0.281	0.027	-0.097

DAS28-Disease activity scor, VAS-Visual analog scale, HAQ-Health assessment questionnaire; NS за све параметре

Урађена анализа није показала постојање значајније корелације између показатеља тежине клиничког испољавања RA и активности ензима укључених у метаболизам пурина (Табела 15).

Корелација параметара тежине клиничког испољавања дегенеративног реуматизма и активности ензима укључених у метаболизам пурина код контролних испитаника приказан је у Табели 16.

Табела 16. Корелација клиничких показатеља са активношћу ензима у контролној групи

Pearson/Spearman Correlation	Ксантин оксидаза	5'-нуклеотидаза	АМРдеза миназа	Аденозин дезаминаза
VAS	-0.411	-0.267	0.497	0.306
HAQ (C)	-0.252	-0.264	0.196	0.054

VAS-Visual analog scale, HAQ-Health assessment questionnaire

Није забележена позитивна корелација клиничких показатеља и активности испитиваних ензима код контролне групе испитанка (Табела 16).

Повезаност активности ензима укључених у метаблизам пурина са фазом RA анализиран је бинарном логистичком регресијом (Enter model) (Табела 17).

Табела 17. Повезаност ензима са фазом реуматоидног артритиса

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
XO	-48.525	49.588	0.958	1	0.328	0.000	0.001	1.0136
5'-NT	-0.017	.006	7.802	1	0.005	0.983	0.972	0.995
AMP deamina za	-0.442	0.770	0.330	1	0.566	0.643	0.142	2.906
ADA	0.123	0.059	4.440	1	0.035	1.131	1.009	1.269
Constant	-0.369	1.200	0.094	1	0.759	0.692		

XO-ксантин оксидаза, 5'-NT- 5'-нуклеотидаза, AMP дезаминаза-аденозин монофосфат дезаминаза, ADA- аденозин дезаминаза; Cox & Snell R Square=0.47; Зависна варијабла - фаза RA (0-касни RA, 1-рани RA)

Учињена регресиона анализа показује да унети модел може објаснити 47% варијансе зависне варијабле што указује на јаку предиктивну вредност модела. У оквиру модела пораст активност 5'-нуклеотидазе испољава значајну повезаност са касним RA (OR=0.98 95%CI 0.97-0.99) док је пораст ADA активности повезан са раним RA (Табела 17).

5.6. Повезаност степена инфламације са ензимима укљученим у метаболизам пурина

Повезаност степена инфламације са активношћу ензима пуриног циклуса сагледавана је биваријантном корелационом анализом (Pearson корелациони коефицијент). Инфламација сагледавана кроз вредности SE, броја леукоцита и проценат гранулоцита, концентрацију фибриногена и CRP-а, корелирана је са активношћу ензима укљученим у метаболизам пурина.

Повезаност степена инфламације са активношћу ензима пуриног метаболизма у групи са касним RA приказан је у Табели 18.

Табела 18. Повезаност степена инфламације са ензимима пуриног метаболизма у групи са касним реуматоидним артритисом

	Ксанитн оксидаза	5'- нуклеотидаза	АМРдезам иназа	Аденозин дезаминаза
SE (mm/h)	0.186	0.140	-0.034	-0.121
Le (G/L)	0.106	-0.082	-0.031	-0.087
Gm(%)	-0.125	0.002	-0.060	-0.206
Фибриноген (g/L)	-0.031	0.015	-0.044	0.008
CRP (mg/L)	0.110	-0.022	0.056	-0.004
RF (IJ/L)	-0.129	0.241	0.071	0.068

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Gm-проценат гранулоцита, CRP-C реактивни протеин, RF-реуматоидни фактор; NS за све параметре

Корелациона анализа није показала значајнију повезаност маркера запаљења са активношћу ензима укљученим у метаболизам пурина у групи са касним RA (Табела 18).

Повезаност степена инфламације са ензимима метаболизма пурина у групи са раним RA приказан је у Табели 19.

Табела 19. Повезаност степена инфламације са ензимима пуриног метаболизма у групи са раним реуматоидним артритисом

	Ксанитн оксидаза	5'-нуклеотидаза	АМРдезам иназа	Аденозин дезаминаза
SE (/mm)	0.247	0.056	-0.070	-0.288
Le (G/L)	0.119	0.203	-0.245	-0.308
Gm (%)	-0.144	0.028	-0.227	0.010
Фибриноген (g/L)	0.075	-0.098	0.162	-0.231
CRP (mg/L)	0.196	0.066	-0.179	0.162
RF (IJ/L)	0.321	0.446	-0.893*	-0.562

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Gm-проценат гранулоцита, CRP-C реактивни протеин, RF-реуматоидни фактор; * $p < 0.05$

Код болесника са раним RA постоји врло јака и значајна инверзна корелација вредности RF и активности АМР дезаминазе ($C = -0.89$, $p < 0.05$). Остали маркери инфламације нису показали значајнију повезаност са активношћу ензима укљученим у метаболизам пурина (Табела 19).

Повезаност степена инфламације са активношћу ензима пуриног метаболизма у групи са дегенеративним реуматизмом приказан је у Табели 20.

Табела 20. Повезаност степена инфламације са ензимима пуриног метаболизма у контроли

	Ксанитн оксидаза	5'- нуклеотидаза	АМР дезаминаза	Аденозин дезаминаза
SE (/mm)	-0.147	0.152	0.811**	0.497
Leu (G/L)	-0.310	-0.416	0.343	0.281
Grn (%)	-0.091	0.123	-0.282	0.230
фибриноген (g/L)	0.102	-0.063	0.357	0.134

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Grn-проценат гранулоцита;

**p<0.01

Урађена биваријантна корелациона анализа показала је постојање јаке и значајне позитивне повезаности брзине седиментације са активношћу АМР деаминазе (C=0.81, p<0.01). Остали параметри инфламације нису показали постојање значајније повезаности са активношћу ензима укљученим у метаболизам пурина (Табела 20).

Повезаност инфламације са фазом RA анализирана је бинарном логистичком регресијом (Enter model) (Табела 21).

Табела 21. Повезаност маркера инфламације са фазом реуматоидног артритиса

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
SE	0.017	0.012	2.123	1	0.145	1.018	0.994	1.042
Leu	0.064	0.136	0.225	1	0.635	1.066	0.818	1.391
Grn	-0.021	0.032	0.456	1	0.500	0.979	0.920	1.042
fibrinogen	-0.650	0.440	2.178	1	0.140	0.522	0.220	1.238
Constant	2.252	2.315	0.946	1	0.331	9.507		

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Grn-проценат гранулоцита; Cox & Snell R Square=0.049; Зависна варијабла - фаза RA (касни RA-1, рани RA-0)

Урађена бинарна логистичка регресија није показала значајнију повезаност брзине седиментације, концентрације фибриногена и броја леукоцита са фазом RA (Табела 21).

5.7. Повезаност маркера инфламације и тежине клиничке слике

Показатељи тежине клиничке слике су корелирани са маркерима инфламације биваријантном корелационом анализом при чему је коришћен одговарајући тест у зависности од типа и дистрибуције обележја.

Корелација маркера инфламације и показатеља тежине клиничке слике RA у групи болесника са касним RA приказана је у Табели 22.

Табела 22. Корелација маркера инфламације и тежине клиничке слике у групи са касним реуматоидним артритисом

	DAS28	VAS	HAQ
Седиментација (mm/h)	0.446**	0.182	0.231
Леукоцити (G/L)	0.318*	-0.005	0.034
Гранулоцити (%)	0.264*	-0.115	0.079
Фибриноген(g/L)	0.264*	0.218	0.209
С-реактивни протеин (mg/L)	0.672**	0.618**	0.724**
Реуматоидни фактор (IU/L)	0.285	0.295	0.441**

DAS28-Disease activity scor, VAS-Visual analog scale, HAQ-Health assessment questionnaire;

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Урађена корелациона анализа показује да активност болести мерена DAS28 скором показује значајну повезаност са свим маркерима инфламације код болесника са касним RA. VAS бола показује значајну повезаност са CRP, док индекс HAQ показује значајну повезаност са CRP и RF (Табела 22).

Корелација маркера инфламације и појединачних показатеља тежине клиничке слике RA у групи болесника са касним RA приказана је у Табели 23.

Табела 23. Корелација маркера инфламације и појединачних показатеља тежине клиничке слике у групи са касним реуматоидним артритисом

	замор	јутарња укоченост	број болних зглобова	број отечених зглобова
Седиментација (mm/h)	0.17	-0.096	0.105	-0.199*
Леукоцити (G/L)	0.086	-0.043	0.141	-0.091
Гранулоцити (%)	0.049	-0.007	0.056	-0.193*
Фибриноген (g/L)	0.159	0.006	0.138	-0.02
С-реактивни протеин (mg/L)	0.701**	0.000	0.671**	-0.264
Реуматоидни фактор (IU/L)	0.221	0.072	0.459**	-0.024

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Урађена корелациона анализа показује да тежина клиничке слике приказана замором, јутарњом укоченошћу, бројем болних и отечених зглобова показује значајну повезаност са маркерима инфламације код болесника са касним RA. Број отечених зглобова негативно корелира са брзином SE и бројем гранулоцита, док број болних зглобова показује позитивну корелацију са вредностима CRP и RF. Замор је значајно повезан са вредностима CRP у овој групи болесника (Табела 23).

Корелација маркера инфламације и показатеља тежине клиничке слике RA у групи болесника са раним RA приказана је у Табели 24.

Табела 24. Корелација маркера инфламације и тежине клиничке слике у групи са раним реуматоидним артритисом

	DAS28	VAS	HAQ
Седиментација (mm/h)	0.608**	0.006	0.441*
Леукоцити (G/L)	0.161	-0.193	-0.053
Гранулоцити (%)	-0.009	-0.165	0.027
Фибриноген (g/L)	0.130	-0.023	0.411*
С-реактивни протеин (mg/L)	0.996**	0.267	0.616*
Реуматоидни фактор (IU/L)	0.666*	-0.351	0.479

DAS28-Disease activity scor, VAS-Visual analog scale, HAQ-Health assessment questionnaire;

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Код болесника са раним RA брзина седиментације и вредности CRP су показали јаку и значајну позитивну повезаност са активношћу болести мереном DAS28 скором $C=0.608$. DAS28 је показао позитивну корелацију са RF. Брзина седиментације, концентрација фибриногена и CRP су такође показали значајну средње јаку повезаност са индексом HAQ ($C=0.44$ и $C=0.41$, $p<0.05$) (Табела 24).

Корелација маркера инфламације и појединачних показатеља тежине клиничке слике RA у групи болесника са раним RA приказана је у Табели 25.

Табела 25. Корелација маркера инфламације и појединачних показатеља тежине клиничке слике у раном реуматоидном артритису

	замор	јутарња укоченост	број болних зглобова	број отечених зглобова
SE (mm/h)	-0.218	0.170	0.524**	0.323*
Leu (G/L)	-0.236	-0.101	0.469**	0.305*
Gpn (%)	-0.498**	0.212	0.175	0.261*
Фибриноген (g/L)	0.061	-0.186	0.132	0.098
CRP (mg/L)	-0.447	-0.169	0.626*	0.618*
RF (IU/L)	-0.863**	0.937**	0.780**	0.896**

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Gpn-проценат гранулоцита, CRP-C реактивни протеин, RF-реуматоидни фактор; * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Урађена корелациона анализа показује да тежина клиничке слике приказана замором, јутарњом укоченошћу, бројем болних и отечених зглобова показује значајну повезаност са маркерима инфламације код болесника са раним RA. Замор негативно корелира са бројем гранулоцита и RF фактором. Јутарња укоченост је значајно повезана са RF фактором. Број болних зглобова показује позитивну корелацију са брзином седиментације, бројем леукоцита, вредностима CRP и RF. Број отечених зглобова је у позитивној корелацији са свим параметрима инфламације осим са фибриногеном у овој групи болесника (Табела 25).

Корелација маркера инфламације и показатеља тежине клиничке слике у групи болесника са дегенеративним реуматизмом приказана је у Табели 26.

Табела 26. Корелација маркера инфламације и тежине клиничке слике у контроли

	VAS	HAQ
SE (mm/h)	0.002	0.267
Leu (G/L)	0.622*	0.315
Grn (%)	0.232	-0.033
Фибриноген (g/L)	-0.296	0.063

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Grn-проценат гранулоцита, CRP-C реактивни протеин, RF-реуматоидни фактор, VAS-Visual analog scale, HAQ-Health assessment questionnaire; * $p < 0.05$

Број леукоцита показао је јаку и значајну позитивну повезаност са VAS скалом ($C=0.62$, $p < 0.05$) (Табела 26).

Корелација маркера инфламације и појединачних показатеља тежине клиничке слике у групи болесника са дегенеративним реуматизмом приказана је у Табели 27.

Табела 27. Корелација маркера инфламације и појединачних показатеља тежине клиничке слике у контроли

	замор	јутарња укоченост	број болних зглобова	број отечених зглобова
SE (mm/h)	0.088	0.225	0.807**	-
Leu (G/L)	0.119	0.124	0.382*	-
Grn (%)	0.112	-0.145	-0.217	-
Фибриноген (g/L)	0.057	-0.005	0.268	-

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Grn-проценат гранулоцита, CRP-C реактивни протеин, RF-реуматоидни фактор; ** $p < 0.01$

Урађена корелациона анализа показује да контролне групе болесника постоји значајна повезаност брзине седиментације и броја болних зглобова (Табела 27).

5.8. Повезаност инфламације и поремећаја метаболизма пурина са појавом реуматоидног артритиса

Табела 28. Повезаност ензима метаболизма пурина са појавом реуматоидног артритиса

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
XO	5.278	11.069	0.209	1	0.647	1.861	0.03	4.60
NT5	0.022	0.014	2.430	1	0.119	1.022	0.99	1.05
AMPdeza minaza	0.059	1.416	0.002	1	0.967	1.061	0.06	17.01
ADA	1.380	0.604	5.220	1	0.022	3.975	1.21	12.98
Constant	-12.411	5.112	5.893	1	0.015	0.000		

Cox & Snell R Square 0.46, Enter model, зависна варијабла RA-1 и дегенеративни реуматизам-0, модел прилагођен према полу и старости болесника

Урађена бинарна регресиона анализа показује постојање значајне везе између активности ADA са појавом RA (ExpB 3.97 95% CI 1.21-12.98) (Табела 28).

Табела 29. Повезаност маркера инфламације са појавом реуматоидног артритиса

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
SE	0.069	0.034	4.142	1	0.042	1.071	1.003	1.145
Leu	0.271	0.206	1.729	1	0.189	1.311	0.876	1.964
Lym	0.041	0.090	0.204	1	0.651	1.042	0.873	1.244
Grn	0.016	0.087	0.035	1	0.852	1.016	0.857	1.206
fibrinog	0.919	0.661	1.933	1	0.164	2.507	0.686	9.157
Constant	-7.307	8.103	0.813	1	0.367	0.001		

SE-брзина седиментације у I сату, Le-број леукоцита, Ly-проценат лимфоцита, Grn-проценат гранулоцита; Cox & Snell R Square 0.15, Enter model, зависна варијабла RA-1 и дегенеративни реуматизам-0, модел прилагођен према полу и старости болесника

Урађена бинарна регресиона анализа показује постојање значајне везе између брзине седиментације и појаве RA (ExpB 1.07 95% CI 1.003-1.145) (Табела 29).

5.9. Карактеристике ензима пуриног циклуса и маркера инфламације код примене Метотрексата

Група болесника са касним RA је додатно стратификована у односу на примењену терапију метотрексатом. Између тако формираних група урађено је поређење активности ензима који учествују у метаболизму пурина. Резултати су приказани у Табели 30.

Табела 30. Активност ензима метаболизма пурина у односу на тип примењене терапије

касни RA	са MTX	без MTX
5' –нуклеотидаза (IJ/L)	8.5±1.3	8.0±1.4
АМП дезаминаза (IJ/L)	1.0±0.2	0.9±0.1
Ксанитн оксидаза (IJ/L)	0.8±0.6	1.1±0.9*
Аденозин дезаминза (IJ/L)	8.95±2.29	21.03±4.43**

Подаци су приказани као средња вредност ± SD, *p<0,05, **p<0,01 наспрам са метотрексатом

Урађена анализа показује значајно већу активност аденозин дезаминазе код болесника са касним RA који нису лечени MTX-ом у односу на болеснике касног RA који су лечени MTX-ом. Такође, забележена је већа активност ксантин оксидазе код болесника са касним RA који нису лечени MTX-ом (Табела 30).

Табела 31. Маркери инфламације у односу на тип примењене терапије

касни RA	са MTX	без MTX
SE (mm/h)	31.41±20.56	27.05±18.97
Le (G/L)	7.31±2.06	6.67±2.83
Gm (%)	63.65±9.48	59.56±9.27*
Фибриноген (g/L)	4.17±0.50	4.16±0.62
RF (IJ/L)	246.86±88.32	259.20±161.90
CRP (mg/L)	96.0±55.42	96.00±72.56

SE-брзина седиментације у првом сату, Le-број леукоцита, Gm-проценат гранулоцита, RF-реуматоидни фактор, CRP-C реактивни протеин; *p<0.05 наспрам групе са Метотрексатом

Урађена статистичка анализа показује да су вредности гранулоцита ниже код болесника са касним RA без терапије MTX-ом ($p < 0.05$). Остали параметри инфламације се нису разликовали код болесника са касним RA у односу на примењену терапију MTX-ом (Табела 31).

6. Дискусија

Реуматоидни артритис је хронично, инфламаторно обољење које настаје услед поремећаја у регулацији имуних механизма. Хроничним и прогресивним током доводи до иреверзибилних деформација зглобова са последичним инвалидитетом болесника.

У основи RA је инфламација, поремећај имуног система и оштећење ћелија. Ензими пуринског циклуса представљају део мреже каскадне реакције инфламаторних ћелија и цитокина. Одређени лекови који се користе за лечење RA болесника као што је MTX, поред осталих ефеката, смањују активност ових ензима (137). Опсежна истраживања су показала да и антиинфламаторни ефекат MTX делимично зависи од метаболичког циклуса пурина.

Иако се класификација RA првенствено темељи на клиничкој слици, последњих година преовладава мишљење да треба полазити од доказаних молекулских биомаркера као показатеља врло раних патогенетских механизма, који се покрећу и пре појаве првих класичних клиничких знакова RA. Проналазак високоспецифичних маркера за постављење ране дијагнозе, давање прогнозе и праћење терапијског одговора, на основу истраживања патогенетских механизма, створио би основу за индивидуални приступ у терапији болесника са реуматоидним артритисом.

Према литературним подацима урађено је више студија о ефектима пуринског метаболизма на почетак и прогресију RA. Оно што је до сада познато је да су ензими пуринског метаболизма повезани са инфламаторним процесом у RA. Механизми деловања ових ензима више су испитивани и доказани у *in vitro* условима него што је то урађено у условима *in vivo*. Није у потпуности познато да ли ензими пуринског метаболизма могу имати предиктивну вредност и да ли њихова активност у серуму болесника са RA може указати на прогресију обољења. Отворено је питање да ли се поједини ензими метаболизма пурина могу користити као биохемијски маркери инфламације или пак маркери активности болести у RA. Управо је то разлог због кога је ово истраживање спроведено, са циљем да се утврди значај метаболизма пурина у реуматоидном артритису.

У истраживању је анализирано 220 болесника, 60 болесника са раним RA, 100 болесника са касним RA и 60 болесника са дегенеративним обољењем, који су чинили контролну групу. Код свих болесника дијагноза је постављена према ревидираним критеријумима за класификацију и дијагнозу RA (ARA/ACR, 1987). Просек старости болесника у раном и касном RA био је приближан старости болесника у контролној групи.

Највећи број болесника са RA био је у старосном добу између 4. и 6. деценије живота што се слаже са подацима из литературе (4). Жене су преовладале у све три групе испитаника, однос према мушком полу био је 43:17 у групи са раним RA, у групи са касним RA 90:10 а у контролној групи 43:17. У раном и касном RA било је више особа женског пола што потврђује литературне податке да жене оболевају од реуматоидног артритиса чешће од мушкараца. У тренутку испитивања забележена је значајна разлика у заступљености пушења између испитиваних група болесника, при чему болесници су са раним RA чешће пушачи од болесника са касним RA и од контроле. У студији Giuseppe-а и коаутора (138) показано је да дугогодишње пушење позитивно корелише са ризиком за појаву RA чак и међу пушачима који пуше мањи број цигарета. Пушење је фактор ризика нарочито код RF позитивних болесника. У студији објављеној 2010. године (139) анализирани су подаци из свих објављених радова од 1966. до 2006. године при чему је праћен однос пушења и осталих могућих фактора ризика за појаву RA. Интересантан је резултат који показује да у односу на непушаче ризик за појаву RA је 26% већи код оних који пуше 1-10 паклица годишње. Код оних који пуше 20 паклица годишње ризик је двоструко већи. Бројне студије су испитивале однос пушења и ванзглобних манифестација у RA. Пушење изазива цитрулинирање синовијалних протеина који постају неоепитопи, покреће се стварање АСРА, што је повезано са апсолутним повећањем нивоа антитела усмерених на цитрулиниране пептиде у серуму. Пушење и HLA-DRB1 (*0101, *0102 и *1001) "заједнички епитопи" синергистички утичу на појаву АСРА.

У нашем истраживању, просечно трајање болести у раном RA износило је у просеку 11 месеци, док је код касног RA и у контролној групи испитаника дужина трајања болести била 10 пута већа. Степен активности болести и тежина RA одређивана је на основу вредности DAS28 и приказана је нумерички. Утврђена је значајна разлика за многе испитиване клиничке параметре између болесника са RA и контролне групе. Оболели од RA имали су значајно већи број болно осетљивих и отечених зглобова. Ниво бола је доминирао код болесника са RA у односу на контролу. То потврђује да испитаници у контролној групи, са дегенеративним обољењем, имају мање изражене субјективне тегобе, клиничке манифестације и биохуморалне показатеље инфламације у односу на оболеле од реуматоидног артритиса.

6.1. Ензими метаболизма пурина у реуматоидном артритису

Пурински циклус је процес интерконверзије пуринских нуклеотида, у коме се АМР, ИМР и ГМР катаболишу и поново ресинтетишу из одговарајућих база. Овај циклус је регулисан вишеструким повратним спрегама при чему битно место заузимају ензими 5'-нуклеотидаза, АМР дезаминаза, аденозин дезаминаза и ксантин оксидаза.

6.1.1. Активност 5'-нуклеотидазе у реуматоидном артритису

5'-нуклеотидаза је од примарног значаја у екстрацелуларној разградњи нуклеотида АМР до аденозина, који преко аденозинских рецептора улази у ћелију и са постојећим аденозином утиче на активност ћелије. 5'-NT разлаже екстраћелијски АМР на аденозин и неоргански фосфор.

Досадашња истраживања показују да активност серумске 5'-нуклеотидазе расте код болесника са RA, при чему се пораст серумске 5'-NT јавља код 30% од 66% болесника са RA (79). Поједини истраживачи истичу (80) да је овај ензим присутан у синовијској течности код 58% болесника са RA, и то у много већој концентracији него у серуму, те испитивање 5'-NT из синовије ових болесника има већу дијагностичку вредност.

Интересантан је резултат овог истраживања који указује на већу активност 5'-нуклеотидазе у касном RA у односу на рани RA и контролну групу испитаника. Активност 5'-NT не зависи од врсте, пола и година живота, а повећање активности овог ензима је карактеристично за болести које су праћене ретенцијом жучи. Анализирањем резултата утврдили смо да нема значајног пораста вредности AST и ALT, који су по локализацији и значају сродни са 5'-NT, те се с правом може закључити да повећана активност овог ензима у касном RA није хепатичног порекла.

Опречни су литературни подаци о улози и пореклу 5' -NT у RA. Већина аутора је сагласна да се повишени нивои овог ензима срећу у активној болести док се нижи нивои очекују у фази ремисије. У једном опсежном истраживању је показано да долази до пада нивоа 5'-NT са годинама старости и да су вредности овог ензима за 27% ниже код мушкараца у односу на жене (140). Тачан разлог веће активности овог ензима код жена у односу на мушкарце није познат али разлика у хормоналном статусу мушкараца и жена може да има кључну улогу (141). У појединим истраживањима није верфикован пораст укупне активности 5'-нуклеотидазе, обзиром на неколико изоензимских форми, већ само пораст јетреног

изоензима код оболелих од RA (142). Насупрот овом, Wortman и сарадници (143) су забележили већу концентрацију синовијске 5'- нуклеотидазе у дегенеративним обољењима у односу на RA.

6.1.2. Активност аденозин монофосфат дезаминазе у реуматоидном артритису

Једна од важних улога АМР дезаминазе односи се на стабилизацију аденилатног енергетског набоја. Њена улога је нарочито значајна за мишићне ћелије обзиром да превенира губитак енергије при великим захтевима. Резултати нашег истраживања показују да нема статистички значајне разлике у активности АМР дезаминазе међу испитиваним групама болесника. Почетак имуноинфламаторног одговора у раном RA се није показао суштински важним за промену активности овог ензима у односу на касни RA. Уз то, и поред очекиваног смањења свакодневних активности, услед постојања бола и отока у зглобовима, није верификован пад активности АМР дезаминазе у раном и касном RA спрам дегенеративних обољења.

6.1.3. Активност аденозин дезаминазе у реуматоидном артритису

Аденозин дезаминаза је још један од суштинских ензима у метаболизму пурина који се налази у мембранској и цитозоларној форми. Претпоставља се да мембранска форма учествује у дезаминацији екстраћелијског аденозина у инозин и транспорту оба нуклеозида у ћелију, док цитозоларна форма има улогу у катаболизму или реутилизацији пуринских нуклеозида у зависности од потреба ћелије.

У овом истраживању су регистроване статистички значајно веће вредности ADA код болесника са RA у односу на контролну групу. Такође, активност ADA је већа у почетном него у каснијем току болести. Средња вредност активности ADA код групе болесника са касним RA је 13.05 ± 6.58 U/L, у групи са раним RA средња вредност испитиваног ензима је 20.42 ± 5.43 , док је у контролној групи 6.19 ± 1.62 U/L. Студије потврђују пораст нивоа серумске и синовијалне ADA код RA у односу на неинфламаторна обољења (144, 145, 146). Често су приказане веће вредности ADA код RA болесника, па тако једна група аутора (147) истиче да је ADA код оболелих од RA 26.67 ± 8.74 а у контролној групи 19.79 ± 5.63 U/L. Surekha је са

сарадницима (98) такође, у свом истраживању приказала високе нивое ADA за RA болеснике 59.79 ± 21.09 а за контролну групу 20.71 ± 5.63 U/L. Ово одударање у активности добијеног ензима можемо објаснити различитим методама испитивања ензима али и транспортом серума добијеног у лабораторији Института где је крв вађена, до лабораторије где је ADA одређивана, узевши при томе у обзир нестабилност ензима на температури преко 4 степена. И поред одударања у нивоу ензима, између различитих студија, наше истраживање потврђује налазе истих (145, 148) да је активност ADA у серуму повећана код оболелих од RA. Већа активност ADA у раном у односу на касни RA се може објаснити повећаном ћелијском пролиферацијом и убрзаним ослобађањем ензима из оштећених ћелија. Такође, повећана активност ADA на почетку болести указује на њен значај у покретању имуног одговора стимулацијом Т ћелијског рецептора и последичној Т ћелијској активацији.

Насупрот нашим резултатима, група аутора (145) је приказала готово исте вредности ADA код болесника са RA и контроле. Слични овом су резултати Yuksel-а и сарадника (146), где се вредности ADA у серуму оболелих од RA, остеоартритиса и реактивног артритиса нису значајније разликовале, при чему је истакнут значај одређивања нивоа овог ензима из синовијалне течности зглоба. Резултати показују да је активност овог ензима већа на почетку болести него у њеном каснијем току, те можда треба размишљати о коришћењу ADA у дијагностичке сврхе. Слично нашем истраживању, Salesi (149) указује на пораст ADA на почетку RA и пад активности овог ензима у каснијем току болести, нарочито при увођењу MTX у терапију. Овакви резултати су у складу са двојаком улогом ADA где је она са једне стране активатор ћелијског имунитета, у коме је процес ћелијске диференцијације праћен чак деветоструким повећањем активности овог ензима, а са друге стране је значајна у катаболизму аденозина са аспекта терапијске ефикасности MTX (149).

6.1.4. Активност ксантин оксидазе у реуматоидном артритису

Активност ксантин оксидазе позната је од 1800. године и од тада је тема бројних студија. О њеној структури, специфичностима и дистрибуцији по органима се доста зна, али се последњих година све чешће поставља питање улоге овог ензима у различитим патофизиолошким процесима. Описани су високи нивои XOR у инфламаторном процесу на експерименталним моделима. Такође, доказана је улога XOR у патогенези оштећења појединих ткива у стањима исхемије и реперфузије.

Испитујући колика је улога ензима метаболизма пурина у реуматоидном артритису испитали смо и вредности ксантин оксидазе у серуму болесника. Активност ХО је била значајно већа у групи са касним РА у односу на групу са раним РА и контролу. У досадашњим истраживања, најчешће експерименталним, није уочено повећање ХО у серуму РА болесника. Постоје студије у којима је приказан пораст ХО у синовијској течности РА болесника. Тако је група аутора (110) испитивањем ХО у синовији оболелих од РА и у контролној групи здравих испитаника указала на већу концентрацију ХО у синовији РА болесника. Забележена је и позитивна корелација између активности овог ензима и инфламације у РА болесника, са значајно већом активношћу ХО у РА у односу на контролне групе испитаника. Слично, у истраживању Aggar-a и сарадника (111) приказана је висока концентарција антитела на ХО у серуму и синовијској течности РА болесника. Они истичу да ова антитела могу имати кључну улогу у РА посредством инхибиције ХО. Такође, могу имати битну улогу у елиминацији ХО из серума и синовијске течности али ће, нажалост, имуни комплекси и даље активирати комплемент и учествовати у одржавању инфламације. Ове закључке потврђује истраживање из 2012. године (112) чији резултати упућују на протективну улогу анти ХО антитела у синовији обзиром да је детектована висока концентарција ових антитела у синовијској течности инфламацијом захваћених зглобова у РА испитаника.

6.2. Тежина клиничког испољавања реуматоидног артритиса и метаболизам пурина

6.2.1. Однос ензима пуринског циклуса и активности болести код болесника са реуматоидним артритисом

Активност болести је могуће проценити на више начина при чему је последњих година најчешће примењиван DAS28 индекс активности болести. Коришћењем овог индекса забележена је просечна висока активност болести ($DAS28 > 5,1$) код болесника са раним РА и умерена активност код групе са касним РА ($3,2 < DAS28 \leq 5,1$). Такође, у обе групе је забележено неколико случајева са високом активношћу болести са DAS28 скором 7,3. Контролна група болесника је имала значајно нижи DAS28 скор од група болесника са РА што је очекиван резултат.

Контрадикторни су резултати испитивања односа активности болести у RA и активности ензима пуринског циклуса. Већина претходних студија је приказала позитивну корелацију активности ADA у серуму RA болесника и маркера активности болести. Група аутора (100) је испитивањем активност укупне серумске ADA код болесника са RA у различитим фазама болести показала да активност ADA у доброј мери корелише са клиничком активношћу болести. Према резултатима Sari и сарадника (148) постоји снажна међузависност укупне ADA и активности болести израженом DAS28 скором код RA болесника. Слично њима, у једној студији која се бавила односом ADA и активност болести код RA болесника показано је да ADA може предвидети активност болести у RA (150).

За разлику од оваквих резултата, постоје студије (151, 152) у којима није пронађена позитивна корелација ADA и параметара активности болести у групи болесника са RA, а поготово код болесника који су били на терапији HCAИЛ и анти TNF инхибиторима. У једном од новијих истраживања (153) којим је обухваћено 110 RA болесника и 55 испитаника контролне групе, није забележена позитивна корелација вредности ADA и активности болести, али је потврђен пораст нивоа ADA у серуму болесника са RA у односу на контролу.

Иако наши резултати показују већу активност ADA код болесника са раним RA, као и повећану активност болести мерену DAS28 скором у раном RA у односу на касни RA, није забележена позитивна корелација активности болести и активности ADA у серуму. Такође, није добијен позитиван однос активности болести и активности 5'-NT. Међутим, регресиона анализа показује да пораст ADA активности повезан са раним RA док пораст активност 5'-нуклеотидазе испољава значајну повезаност са касним RA. У доступној литератури нема довољно података о односу AMP дезаминазе и активности болести код болесника RA. Резултати овог истраживања указују на слабу али значајну негативну повезаност DAS28 скор са вредностима AMP дезаминазе, али не и са активношћу 5'-нуклеотидазе или ADA код болесника са касним RA. Овај налаз нам указује да је у условима хроничног инфламаторног стања које постоји у касном RA, ипак најзначајнија детерминанта ћелијског оштећења и зглобне деструкције условљеног нагомилавањем аденозина, пораст активности 5'-NT коју не прати адекватан пораст активности ADA уз, наравно, перзистирање ниске активности AMP дезаминазе. Потврда ове констатације лежи у чињеници да код болесника са раним RA, код којих нема пораста активности 5'-NT, нема ни значајније корелације показатеља тежине клиничке слике са активношћу ADA или AMP дезаминазе. Потврду ових констатација смо добили у истраживању (101) у коме је мерењем количине аденозина пронађено да је количина аденозина 4,5 пута повећана у условима хроничне хипоксије ткива што аутоматски доводи до индукције ADA. И учињена бинарна регресиона анализа нашег истраживања, показује да је

порастан активност 5'-NT удружен са касним RA док је повећана активност ADA удружена са раним RA.

Интересантно је истраживање Stolk-а и сарадника (140) који су, вођени претходним истраживањима у којима је истакнута значајна повезаност активности болести и ензима пуриног циклуса, формирали хомогену групу испитаника. То је подразумевало да је дијагноза RA постављена унутар 12 месеци од првих тегоба и да није започета терапија DMARD или Преднизолоном. Резултати су показали да нема или постоји веома слаба корелација пуринске ензимске активности и DAS28 скорa код RA болесника. Једина промена коју су они забележили јесте значајан пад активности 5'-NT са годинама старости.

Резултати неколико студија (100, 152) указују да се ADA и њени изоензими могу користити као алтернативни параметри у приказивању активности болести. Наиме, забележена је јасна корелација између активности болести у RA и каталитичке активности укупне ADA и ADA2 изоензима. Такође, ови аутори истичу да са прогресијом болести долази до повећања како ADA тако и његове изоензимске форме ADA2.

6.2.2. Однос ензима пуриног циклуса и функцијске способности болесника са реуматоидним артритисом

Реуматоидни артритис, као прогресивна болест, у свом природном току доводи до губитка функцијске способности различитог степена интензитета, а може довести и до потпуног инвалидитета. Способност болесника да обављају свакодневне активности бива нарушена. Због болова, оштећења и деформације зглобова више од 60% болесника са RA не може да обавља свакодневне кућне послове а више од 40% има проблем у односима са пријатељима и породицом (154). Котришћењем HAQ упитника испитали смо функцијску способност испитаника. Тежу функцијску неспособност забележили смо у групи са касним RA (23,7%), док је код раног RA и у контроли доминирала умерена неспособност. Нисмо забележили потпуну физичку неспособност у испитиваним групама болесника. Овакви резултати потврђују бројна претходна истраживања која су показала да функцијски капацитет првенствено зависи од дужине трајања болести, активности болести и зглобног оштећења. Океп је са сарадницима (155) истакао активност болести и дужину трајања болести као основне параметре који утичу на функцијску способност болесника са RA. Старије животно доба и висок ниво бола били су у вези са мањом функцијском способношћу али нису предиктори функцијске неспособности. Обзиром да је једино активност болести имала утицај

на функцијски капацитет, то је још један разлог због кога треба рано започети терапију у циљу смањења активности болести а самим тим и побољшања способности болесника да обављају свакодневне активности.

Код наших болесника дужина трајања болести у раном RA је просечно износила 11 месеци док је код групе са касним RA болест трајала у просеку 10 година. Такође, радиолошке промене су биле израженије у групи са касним RA у односу на рану фазу. Очекивало се да у контролној гупи болесника способност болесника да обављају свакодневне активности буде очувана или бар у мањем проценту заступљена умерена неспособност. Резултати су показали да је и у контролној групи испитаника умерена неспособност доста заступљена чак 96,5%, што поново упућује на недовољну објективност HAQ упитника, али и на проблем који дегенеративни реуматизам носи. 2001. године је објављена студија у којој је у периоду од девет година праћено 378 болесника, а резултати обрађивани треће, шесте и девете године од почетка студије. Показано је да се функцијски капацитет погоршава у току болести, при чему након три и шест година активност болести битно утиче на функцијску способност, док након шест и девет година оштећење зглобова узима улогу важнијег чиниоца (52).

Досадашња сазнања о утицају ензима пуриног циклуса на функцијску способност оболелих од RA углавном су приказана индиректно, у радовима који су за циљ имали да испитају утицај терапије MTX на промену нивоа пуринских ензима. Поређењем вредности индекса HAQ и нивоа ензима пуриног циклуса у серуму болесника са RA и контроли нисмо уочили значајнију повезаност између функцијске способности болесника и активности ензима пуриног циклуса. У току контракције долази до смањења креатин фосфокиназе и пораста АМР у мишићним влакнима (83, 84). Са смањењем физичке активности долази до благог пада активност АМР па смо сходно овом механизму очекивали мању активност АМР код функцијски слабије способних болесника. Међутим, испитивање функцијског статуса болесника са RA обухвата основне физичке активности као што су устајање, хватање и отварање предмета, лична хигијена и остало, те је вероватно мала разлика у активности мишића међу групама разлог због којег у серуму не долази до значајне промене у активности АМР.

Најчешће се истиче значај активности болести на функцијску способност оболелих од RA. У истраживању у коме су учествовали болесници из 6 клиничких центара (156) са просечним трајањем болести 8 година, потврђени су ставови да активност болести има највећи утицај на функцијску способност болесника, док зглобно оштећење добија на значају са прогресијом болести. Међутим, обзиром да су многобројне студије имале за циљ да идентификују предикторе функцијске неспособности у RA, приказани су и супротни

результати. У студији Toussiroт-a (157), најбитније варијабле на почетку, као и након годину дана трајања болести, јесу женски пол и старије животно доба. У тој студији издвојен је значај активности болести и радиолошке прогресије у смањењу функцијске способности болесника. У великој студији (158) којом је обухваћено 2775 болесника са дужином трајања болести 10 (DAS28 4,0 HAQ 0.79.) закључено је да DAS28 испод вредности 2,6 корелише са повећањем функцијског капацитета док DAS28 преко 2,6 нема утицаја на функцијску способност болесника, тј истакли су значај ремисије болести за побољшање функцијске способности болесника.

6.3. Повезаност степена инфламације са активношћу ензима метаболизма пурина у реуматоидном артритису

Патогенеза RA је сложен процес који обједињује читав низ имунолошких и инфламаторних реакција. Почетак и одржавање инфламаторног процеса зависи од Т ћелијског одговора. У процесу Т ћелијске активације учествују CD4⁺ Т-ћелије које, након обраде антигена од стране молекула HLA класе II, стимулишу моноците, макрофаге и синовијске фибробласте на продукцију интерлеукина (IL-1 и IL-6) и фактора некрозе тумора алфа који воде ткиво у инфламацију. Такође, CD4⁺ ћелије стимулишу В ћелије на продукцију имуноглобулина, укључујући реуматоидни фактор (RF), а посредством остеопротегерина стимулишу остеокластогенезу (10, 159). Проинфламаторни цитокини стимулишу продукцију протеина акутне фазе при чему највећу улогу има IL-6. IL-6 условљава преусмеравање акутне у хроничну инфламацију која доводи до преваге цитотоксичних медијатора и оштећења ткива (160).

Аденозин дезаминаза има значајну улогу у процесу инфламацијом посредованог оштећења ткива. У раном RA најважнија је специфична активација ћелија Т антигеном, а како обољење напредује, мрежа и утицај цитокина постају стални и утврђени. На тај начин се инфламација одржава реакцијама које више не зависе од антигена (161, 162). Обзиром на посредовање ADA у Т ћелијској активацији, овај ензим је индиректно укључен у дејство цитокина.

Испитали смо да ли код болесника са RA, на почетку и у каснијем току болести, постоји узајамна веза између параметара инфламације и ензима пуринског циклуса. Утврдили смо да код болесника са раним RA нема значајне повезаности активности 5'-NT, ADA, XO и

нивоа CRP-а, RF-а, фибриногена у крви, као ни позитивне корелације са брзином SE, бројем леукоцита и гранулоцита. Сличне резултате смо добили и у групи болесника са каснијим RA где активности ензима пуринског циклуса које смо испитивали, нису биле у корелацији са параметрима инфламације. Обзиром на досадашња истраживања, која показују да је аденозин дезаминаза једна од кључних компоненти у отпочињању ћелијски посредованог имуног одговора и да, сагледана засебно или у склопу осталих налаза код болесника са реуматоидним артритисом, помаже у дијагностификовању ове болести, очекивали смо позитивну корелацију параметара инфламације и ADA. Међутим, ниво ADA, иако повећан у раном у односу на касни RA, није корелисао са параметрима инфламације. То значи да пораст инфламаторних параметара у серуму RA болесника није нужно праћен порастом ADA, те да је допринос ових биохемијских маркера у процесу развоја инфламаторног процеса комплетно независан.

Многи аутори сматрају да се ADA може користити као биохемијски маркер инфламације и да стандардни показатељи као што су SE и CRP све више губе на значају (94, 145, 161). Nalesnik је са групом истраживача показао да постоји значајан пораст каталитичке активности ADA код болесника са RA у односу на здраву групу испитаника (145). Pacheco и сарадници су истакли да ADA на непосредан начин, активацијом Th1 одговора, поспешује продукцију проинфламаторних цитокина, те тако заузима битно место у процесу инфламаторног одговора (117). У једном опсежном истраживању (148) укупна ADA код RA болесника била је значајно већа него код контролне групе, уз чињеницу да пораст активности овог пуринског ензима није био праћен порастом CRP-а и брзине седиментације. Такође, Palinti и сарадници (147) су истакли значај појединих биохемијских маркера RA укључујући ADA али, слично нашим резултатима, нису пронашли везу између ADA и SE и CRP. Salesi и сарадници (149) су показали да постоји позитиван однос ADA и SE на почетку испитивања, пре започињања терапије MTX-ом, али да се са започињањем терапије бележе значајне промене у активности ADA.

Има аутора (148,163) који су, истраживајући активност укупне ADA и њених изоензима ADA1 и ADA2 код RA болесника, закључили да су укупна ADA и изоензим ADA2 блиско повезани са манифестацијом RA те се могу у будућности искористити као биохемијски маркери инфламације.

Улога 5'-NT и XO у инфламаторном одговору реуматоидног артритиса није јасно дефинисана. Контроверзни су резултати улоге 5'-NT у развоју RA. По некима (79), благи пораст овог ензима у синовијској течности у RA узима учешће у инфламацији зглобова, обзиром да код неинфламаторних обољења нема повишених нивоа овог ензима. Резултати појединих студија (100, 141) показују пораст 5'-NT уз пораст полиморфонуклеарног одговора

у синовијској течности инфламраних зглобова, што је схваћено као независна појава акутне инфламаторне реакције унутар зглоба. Они сматрају да активност 5'-NT у синовијској течности представља користан индикатор активности инфламаторног процеса у синовијској мембрани али да 5'-NT у серуму нема исти значај. Већина других истраживача истиче да је значај овог ензима у инфламаторном одговору RA занемарљив, обзиром да и када је верификован пораст 5'-NT у синовијској течности тај пораст нема статистичку значајност. Неконзистентност резултата могућа је последица различито дизајнираних студија, обзиром да се студије разликују у односу на старост болесника, претходно започету терапију, али и у односу на методе испитивања ензима. Осим малобројних радова који указују на повећање XO у синовијској течности болесника са RA (110, 111), већина не приказује повећање XO у серуму или синовији ових болесника.

У стањима ћелијског оштећења, активација AMP дезаминазе води стварању IMP и уз повећану активност нуклотидаза, акумулацији хипоксанитина. Овај метаболички пут AMP присутан је у стањима када је неопходно активирати Т лимфоците и започети инфламаторни одговор. Уједно, стимулација аденозин дезаминазе смањује количину аденозина који у наномоларним концентрацијама поспешује инфламаторни одговор и хемотаксу посредством рецептора великог афинитета којима блокира стварање cGMP. Уколико је смањена активност аденозин деаминазе, расте концентрација аденозина који посредством рецептора малог афинитета инхибира инфламацију и смањује оксидативни стрес уз пораст cGMP у ћелијама. Због тога је битно у сагледавању инфламације пратити однос AMP дезаминазе и ADA. Свако повећање односа AMP дезаминаза/Аденозин дезаминаза резултује смањењем оксидативног стреса и инхибицијом инфламације уз пораст репарације ћелија, али у кратком временском периоду. У дужем периоду би због накупљања аденозина цитотоксички ефекти били израженији. Обзорим на кратак живот аденозина, од око 10 секунди, праћење активности ова два ензима представља најбољи начин да се сагледа активност инфламаторног процеса како у акутним тако и у хроничним инфламаторним стањима.

Студије које су пратиле активност ових ензима у RA показују да примена MTX доводи до смањења активности ADA и може послужити као маркер успешности терапије. Међутим, не треба заборавити чињеницу да хронични пораст концентрације аденозина има врло негативну улогу на ендотел и друга ткива као што је показано у моделима хроничне хипоксије. Зато је за успешан одговор на MTX, али и било који агенс који би се користио у терапији RA, потребно и да активност AMP дезаминазе остане очувана те да метаболизам AMP преко IMP иде ка стварању мокраћне киселине (што подразумева перзистирање нискостепене хроничне инфламације) или у најоптималнијим условима и редукција

активности нуклеотидаза, чиме би се повећала резерва АМР без усмеравања његовог пута ка аденозину, већ ка стварању IMP. Ово је у складу са налазима ниске активности овог ензима код младих ћелија и ћелија у пролиферацији, као и код здравих особа (64).

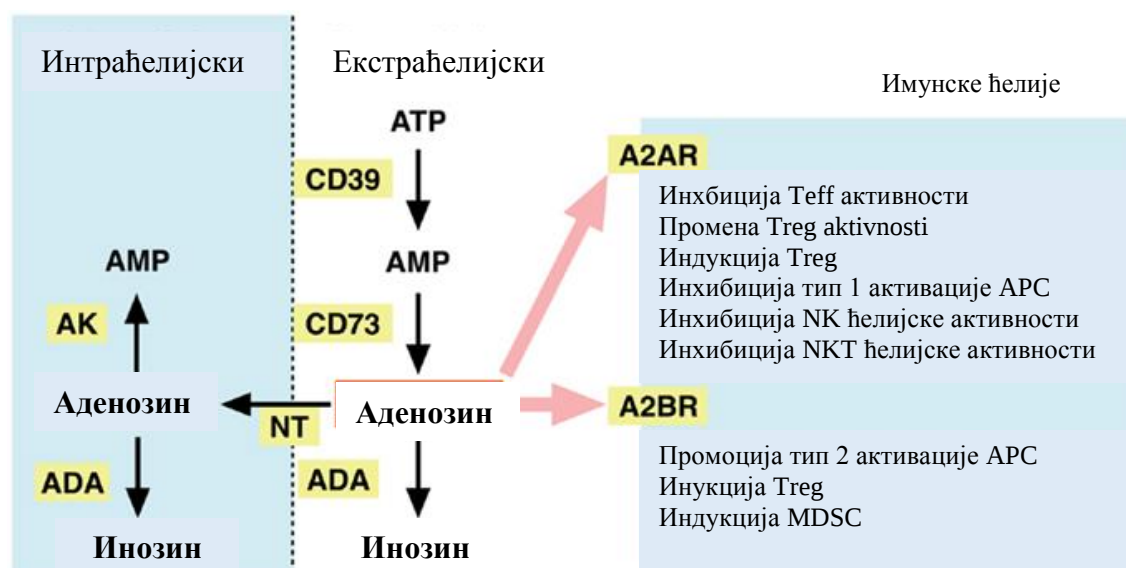
У стањима хроничне инфламације као што је у RA, активност 5'-NT је често повећана (79) што указује на потенцијални инфламаторни значај овог ензима. Патогенетски, у овој ситуацији са повећаном активношћу нуклеотидаза, повољан терапијски ефекат би могле имати супстанце које смањују активност АМР дезаминазе а појачавају активност ADA те би се високостепена инфламација (стање са великом активношћу АМР дезаминазе и великом количином аденозина) на овај начин трансформисала у нискостепену инфламацију са ниским количинама аденозина.

Поред ове про / антиинфламаторне “клацкалице” у којој значајну улогу имају АМР дезаминаза и АДА још један важан механизам контролише инфламаторни одговор разних ћелијских популација посредством усмеравања хипоксанитина и ксанитна у правцу стварања деградационог продукта, мокраћне киселине, или пак реутилизације нуклеотида за поновно стварање АМР. Кључну улогу у овом механизму има ксантин оксидаза која представља лимитирајући корак у овом процесу. Њена улога би се најбоље могла описати као модулатор про/антиинфламаторне “клацкалице” који са смањењем активности ХО спушта све про/антиинфламаторне процесе на нижи ниво и тиме уводи ћелије у стабилно стање или пак повећањем своје активности доводи до смањења инозина а самим тиме и омогућава несметану и брзу деградацију АМР и аденозина са амплификацијом инфламаторних и проинфламаторних механизма. Уједно, у стањима са повећаном активношћу ХО и порастом продукције мокраћне киселине, расте и интензитет оксидативног стреса јер долази до стварања суспероксид ањона, водоник пероксида и хидроксилног радикала (116). На тај начин ХО може редукцијом своје активности помагати инфламаторно/репарационе механизме али и доести до озбиљних оштећења ћелија и хипероксидативног стреса.

Сагледавајући наше болеснике са RA можемо уочити да се инфламација није развијала и перзистирала посредством АМР дезаминазе и стварањем IMP, јер су све испитиване групе болесника имале сличне вредности АМР дезаминазе као и контрола. Међутим, активност ADA је била значајно већа код свих болесника са RA што указује да је деградација АМР ишла преко аденозина у инозин и да би у условима са нормалном активношћу нуклеотидаза ово био механизам у коме би мале количине аденозина преко рецептора малог афинитета поспешивале инфламаторни одговор и хемотаксу. Овај механизам је присутан код болесника са раним обликом RA. Међутим, претходно теоретски дискутована варијаната инфламације са повећаном активношћу нуклеотидаза и ADA (уз смањење односа АМР дезаминаза/ADA), која

за последицу има бржу деградацију АМР и више нивое аденозина, нађена је код болесника са касним обликом РА. Овај налаз нам показује да хронични пораст аденозина у ових болесника можда представља главни патогенетски фактор одржавања инфламације и цитотоксичног оштећења ткива.

Активност CD39 и CD73 доводи до продукције екстраћелијског аденозина. Екстраћелијски аденозин се смањује захваљујући активности ADA зависног катаболизма и ћелијском преузимању преко нуклеозидних транспортера. Аденозин у интраћелијском делу се конвертује у АМР помоћу аденозин киназе или катаболише уз помоћ ADA (164).



Слика 9. Улога екстраћелијског аденозина у ћелијском имунитету- адаптирана слика преузета од Ohta A и сар. (164)

Метаболичке промене у инфламацији доводе до пораста екстраћелијског аденозина. Продукција аденозина може да супримира проинфламаторну активност и превенира даље оштећење. У инфламираном и изразито хипоксичном ткиву локални нивои аденозина могу бити довољно високи да активирају не само A2A рецепторе већ и A2B аденозинске рецепторе. A2B рецептори узимају улогу у контроли инфламације индукцијом антиген презентујућих ћелија. На овај начин инфламацијом узрокован пораст екстраћелијског аденозина иницира негативан повратан одговор преко A2A и A2B рецептора. Овај аденозин-A2Aрецептор/A2Bрецептор пут служи као неопходан имунорегулаторни механизам који регулише опсег имуног одговора.

Поред овог заједничког патогенетског именитеља инфламације (деградација АТР посредством аденозина) који је израженији код болесника са касним РА због пораста

активности нуклеотидаза, и модулаторна улога ХО је такође присутна са различитим утицајем. Наиме, у болесника са касним РА активност ХО је значајно већа што нам указује на бржу деградацију нуклеотида и њихову мању реутилизацију као директни показатељ степена инфламације. Поред тога, пораст активности ХО уз стварање слободних радикала доводи и до изразитог цитотоксичног ефекта. Све ово присутно је код болесника са касним РА, али не и код болесника са раним РА и контроле, чиме се ова група болесника јасно издваја по свом инфламаторном и цитодеградирајућем потенцијалу. Битно је додати да су просечне вредности мокраћне киселине у свим групама болесника биле сличне што указује на недовољну клиничку сензитивност овог метаболита у процени степена инфламације и њеној патогенези за разлику од активности АМР дезаминазе, АДА и 5'-NT.

6.4. Повезаност инфламације и клиничких манифестација реуматоидног артритиса

Аутоимуне болести као што је реуматоидни артхритис настају као последица константног дисбаланса између про и антиинфламаторних механизма имуног система који воде у хроничну инфламацију. Оштећење синовије зглоба деловањем инфективног агенса или другим механизмом представља почетак инфламаторног одговора у РА. Системска и локална инфламација одржавају се захваљујући аутоимуном процесу који доводи до прогресивног и деструктивног синовитиса. Упала зглоба се јавља као одговор на продукцију фактора раста, цитокина, хемокина од стране бројних типова ћелија синовије и хрскавице. За сада нема специфичног биохуморалног показатеља активности болести. Није познато који параметар акутне фазе запаљења најбоље одражава степен активности болести и да ли њихови нивои у синовијској течности или крви могу бити показатељи тежине клиничке манифестације болести.

За РА је карактеристична перзистентна инфламација са примарним захватањем периферних зглобова који постају отечени, болни и укочени. Бројање отечених зглобова је клинички метод за одређивање тј. бројање упаљених зглобова. Насупрот отоку, палпаторна осетљивост зглобова је у блиској вези са присуством бола код болесника. Иако готово сваки реуматолошки преглед укључује пажљиво и детаљно испитивање зглобова, одређивање броја захваћених зглобова не спада у стандардне клиничке процедуре. већ се они изражавају кроз различите индексе активности болест. Резултати нашег истраживања показали су да је број

палпаторно осетљивих зглобова код болесника са раним и касним RA био значајно већи у односу на контролу, као и да је палпаторна осетљивост зглобова приближно исто заступљена у раном RA и у каснијем току болести. Нема значајне разлике у броју отечених зглобова код болесника са раним и касним RA. У раном RA број палпаторно осетљивих зглобова и број отечених зглобова је позитивно корелирао са свим испитиваним параметрима инфламације. У касном RA позитивна корелација је забележена само између броја осетљивих зглобова и CRP-а док је број отечених зглобова био у негативној корелацији са SE и бројем гранулоцита. Овакви резултати потврђују до сада објашњене патогенетске механизме у покретању и развоју RA где инфламаторни одговор узима огромно учешће. У једној од новијих студија (165) показано је да код 36% болесника постоји неслагање при оцењивању палпаторне осетљивости и отока зглобова од стране различитих истраживача. Различито искуство истраживача као и праг бола јесу фактори који у великој мери одређују коначне резултате.

Демографске, клиничке, лабораторијске и "imaging" методе у комбинацији или појединачно се користе код RA болесника зарад што бољег одређивања активности болести, али и предвиђања тока болести. У одсуству појединачног биомаркера који би представљао златни стандард, можда је комбинација композитних индекса и појединачних параметара најбоље решење у сагледавању активности болести RA болесника. Када су показатељи акутног фазног одговора дискординантни, уз пораст само SE или само CRP, ове резултате не треба користити у сагледавању активности болести и структурног оштећења зглобова. Комбиновањем клиничких параметара и различитих индекса активности болести добијају се најпоузданији резултати. Имајући у виду ове чињенице, ми смо у истраживању поред DAS28 индекса користили и остале могуће показатеље инфламације, акутног фазног одговора, а у циљу бољег сагледавања активности болести.

Већина болесника наводи замор као један од фактора који највише утиче на њихов живот. Иако се најчешће манифестује у виду израженог и трајног умора, менталне слабости, физичке слабости или обе, чињеница је да званичне дефиниције замора нема. Бројне студије показују да је замор код највећег броја болесника мултидимензионална појава која обухвата бол, психичко стање и претходну физичку активност (165). Литературни подаци показују да су бол, физичка нестабилност, дужина трајања болести, коморбидна стања, мања физичка активност и женски пол предиктори појаве замора код RA болесника (166, 167).

Наши резултати потврђују чињеницу да је замор израженији код дужег трајања болести и веће функцијске неспособности обзиром да је забележена значајна разлика у појави замора међу групама. Присуство замора је најчешће код болесника са касним RA (58%) док се у контролној групи болесника са дегенеративним реуматизмом најређе јављао. Замор је

једино позитивно корелирао са CRP у касном RA. Треба истаћи да је одређивање замора субјективна метода, при чему болесници чешће појаву замора повезују са болом. Има студија (168, 169) у којима је показано да више од 50% испитаника болесника са RA има замор при израженој активности болести. Анализирајући колико је учешће инфламације у појединим клиничким манифестацијама RA, Bergman и сарадници (167) су на групи од 2096 болесника показали да замор не представља инфламаторну компоненту и да није повезан са активношћу RA. Замор у њиховом истраживању није био повезан са бројем болних и отечених зглобова као ни са брзином седиментације већ је значајно корелирао са скалом активности болести пацијената. Слично овом истраживању, група аутора (165) је показала да је замор у блиској вези са функцијском способношћу, али не и са инфламаторним процесом.

Јутарња укоченост је важан симптом за постављање дијагнозе и праћење клиничког тока болести. Као општа карактеристика синовијске инфламације присутна је како у RA тако и у другим системским реуматским обољењима, а објашњава се постојањем ослабљене циркулације, пропратним миозитисом и хистохемијским променама у основној супстанци везивног ткива, које се дешавају током спавања. Бројна досадашња истраживања показују да јутарња укоченост зависи од степена синовијске инфламације и да исчезава у фази ремисије. Међутим, у многим студијама је показано да је јутарња укоченост присутна упркос смањеној активности болести (170, 171). Наши резултати показују да нема разлике у трајању јутарње укочености између болесника са RA без обзира на фазу болести, али да је јутарња укоченост значајно дужа код RA болесника него код групе болесника са дегенеративним реуматизмом. Није забележена корелација јутарње укочености са испитиваним параметрима инфламације. Разумевање јутарње укочености је у самој патофизиологији болести и зависи од циркадијарног ритма односа проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина и кортизола (172, 173, 174).

Брзина седиментације и концентација C-реактивног протеина су прихваћени као најважнији маркери акутног фазног одговора (175). Доказано је да је CRP одличан маркер инфламације, као и да има улогу у активацији комплемента у RA, при чему се значајност CRP-а огледа у његовом порасту чак и пре појаве симптома болести. Резултати недавно објављеног истраживања (176) показују да је ниво CRP-а у крви најбољи показатељ степена активности и предиктор тежине RA док концентрација CRP-а у синовијској течности није добар показатељ инфламаторне реакције. Такође, истакнуто је да концентрација CRP-а у крви може бити корисна за процену ране активности RA, што налаже брзо отпочинајње имуномодулаторне терапије. Како је CRP осетљив, али неспецифичан маркер инфламације треба га увек посматрати у склопу клиничке слике болесника, при чему је пожељно поредити

тренутне вредности са претходним. Представља један од најчешће и најбрже повишених протеина од свих реактаната акутне фазе, што указује да је CRP део природног имуног одговора (177, 178). Поређењем нивоа CRP-а у серуму болесника са RA и контролној групи забележен је значајно већи ниво CRP-а код RA болесника него код дегенеративних обољења. Ово је разумљив налаз обзиром да је RA хронично инфламаторно обољење те је и у почетној и каснијим фазама болести CRP повишен у односу на контролну групу. Забележили смо значајну повезаност активности болести и CRP-а у раном RA, док у касном RA није било позитивне корелације. Такође, ниво бола и функцијска способност показују значајнију повезаност са нивоом CRP-а у серуму. Претходне студије су указале на позитивну корелацију између нивоа CRP и активности болести мереном DAS28 индексом. Повезаност инфламације и активности болести је потврђена и у нашем истраживању. CRP није само показатељ активности болести већ има и прогностичку вредност у зглобној прогресији и промени функцијског статуса (179, 180, 181).

Упоређујући брзину седиментације по групама јасно је показано да је брзина SE значајно већа у групама са RA у односу на контролну групу. Код болесника у раној фази RA брзина седиментације је показала јаку и значајну позитивну повезаност са активношћу болести. Брзина седиментације и концентрација фибриногена су такође показали значајну средње јаку повезаност са функцијском способношћу болесника.

Према добијеним резултатима број еритроцита и концентрација хемоглобина су значајно нижи код RA болесника него код контроле. Анемија у реуматоидним артритисом се обично испољава у виду благе нормоцитно-нормохромне или лако хипохромне анемије, чији степен корелише са протеинима акутне фазе, брзином седиментације и осталим параметрима активности болести. Хронична инфламација је узрок анемије у 2/3 оболелих од RA (181). У досадашњим публикацијама најчешће је приказана изражена корелација анемије и клиничких параметара активности болести као што су болни и отечени зглобови, слабост мишића, смањење снаге мишића, као и погоршање ових клиничких показатеља са напредовањем анемије (182, 183).

Иако већина досадашњих истраживања бележи анемију у дужем току болести, добијени резултати не указују на статистички значајну разлику ових параметара у групи са раним и касним RA. Снижене концентрације еритропоетина и смањен одговор на еритропоедин патофизиолошки су повезани са инхибиторном улогом појединих цитокина као медијатора инфламације зглобова. Ниже концентрације хемоглобина су највероватније

последица деловања инфламаторних цитокина на метаболизам гвожђа и еритропоезу у костној сржи.

Резултати недавно објављених студија (184, 185) указују, да инфламаторни процес није основни узрок бола. Анализирајућу повезаност нивоа бола и појединих параметара инфламаторног одговора, нисмо забележили позитиван однос. У све три групе испитаника ниво бола мерен VAS скалом није био у корелацији са параметрима инфламације. Све већи број истраживача указује на депресију и анксиозност болесника као битне факторе нивоа бола (168, 184, 186, 187). Интересантна је студија (188) у којој је показано да је периферна инфламација један од основних узрока бола у артритису, али да и други разлози, као што је механизам не-инфламаторног централног бола, могу учествовати у појави бола. У 10-годишњем праћењу RA болесника (160), показано је да женски пол, анксиозност и брзина SE независно објашњавају промену нивоа бола, као и да бројни клинички и демографски фактори доприносе одржавању бола.

Маркери инфламације као што су CRP, фибриноген, RF, седиментација, концентрација хемоглобина и број еритроцита имали су јасну повезаност са присуством RA, али недовољну сензитивност у демаркацији фазе болести (сличне вредности у групама са раним и касним RA). Једино је број леукоцита имао предиктивну вредност не само у постојању RA већ и у демаркацији фазе болести, што може бити последица пролиферативног потенцијала аденозина на Т и Б лимфоците.

Реуматоидни артритис се од осталих хроничних инфламаторних артропатија разликује по израженој склоности ка зглобној деструкцији. Механизми који воде ка деструкцији зглобова нису у потпуности истражени, али проинфламаторни цитокини и активација остеокласта имају водећу патогенетску улогу. Изражена деструктивна природа ове болести се манифестује појавом ерозија у 10 до 26% болесника са RA након 3 месеца од појаве првих симптома болести (35), а код 60% болесника у првих годину дана. Након две године од почетка болести чак 75% болесника има ерозивне зглобне промене (189). Потврда постојања зглобне деструкције уочава се временом, обзиром да са повећањем зглобне деструкције долази до смањења функцијске способности.

Наши резултати су потврдили постојање значајне разлике у дистрибуцији тежине анатомских стадијума болести по Stenbrocker-у измедју група болесника са RA. Лакши стадијуми су били знатно чешћи налаз код болесника са раним RA, а тежи стадијуми код болесника са касним RA. Однос зглобне деструкције и синовијске инфламације још увек није довољно разјашњен. Ране промене на костима, као што су едем и разређење костију настају у одсуству синовитиса, што указује на могућ различит патогенетски механизам синовијске

пролиферације и зглобне деструкције. Треба истаћи да синовитис и ерозије зглоба могу имати различиту еволуцију са различитим одговором на примењену болест модификујућу терапију. У нашој испитиваној групи болесника са раним RA није било деструктивних и анкилозирајућих промена, али је упркос рано постављеној дијагнози код мањег броја болесника (6,9%) верификован III стадијум радиолошких промена по Stenbrocker-у, док је највећи број испитаника (34,5%) имао радиолошке промене I стадијума. Концепт савременог лечења RA болесника подразумева рано откривање ове болести пре радиолошких промена. Обзиром да је код болесника из наше групе са раним RA дијагноза постављена у оквиру 12 месеци од почетка болести очекивано је и у складу са претходним резултатима да мањи део болесника има ране ерозивне промене али да нема болесника са анкилозом зглобова. У групи са касним RA забележили смо најчешће присутан III анатомски стадијум (40,7%) док је само 15,3% болесника имало почетне радиографске промене. Сличне резултате приказали су Machold и сарадници (35) који су пратили 55 болесника у периоду од 3 године. Ерозивне промене на крају треће године имало је 63,6% болесника, при чему је највећи део промена (74,3%) био присутан већ на крају прве године. Група сарадника (190) је анализирајући 1888 зглобова утврдила да постојање синовитиса повећава ризик за прогресивну деструкцију зглобова. Такође, истакли су да клинички параметри болести и ултразвучни преглед зглобова у комбинацији могу да послуже успешнијем, квалитетнијем праћењу структурних оштећења зглобова у RA болесника.

Иако се наши резултати могу поредити са већином резултата осталих истраживача, треба истаћи да је често присутно неслагање међу резултатима. Радиографски скоринг системи пружају информације о присутности и нивоу оштећења зглобова, као и могућност праћења ефекта примењене терапије. Међутим, у много случајева подаци једне студије не могу бити директно упоређени са подацима осталих студијских истраживања, посебно ако је коришћен другачији скор систем или су карактеристике испитаника при укључивању у студију биле другачије.

Коришћењем сензитивнијих дијагностичких процедура, нарочито ултрасонографским прегледом зглобова, могу се детектовати ране промене мекоткивних структура и на тај начин убрзати постављање дијагнозе RA. Међутим, за сада, за процену и праћење зглобног оштећења у RA радиографија и даље заузима водеће место.

6.5. Значај Метотрексата у контроли активности ензима метаболизма пурина у серуму болесника са реуматоидним артритисом

Крајем 80-их година прошлог века учињен је значајан напредак у лечењу RA, прихватањем МТХ-а као ефикасног и сигурног лека за лечење ове болести. Од 90-их година започело се са применом биолошких лекова који делују на кључне механизме имунорегулације у RA. Концепт савремене терапијске стратегије "лечење ради постизања циља" ("treatment to target") има за циљ постизање ремисије или ниске активности болести. Основни терапијски принципи подразумевају примену нестероидних антиинфламаторних лекова, DMARD, глукокортикоида и све чешће примену биолошких лекова. Због добре подношљивости, доказане ефикасности, великог терапијског опсега, али и ниске цене МТХ је први препоручени и најчешће коришћен болест модификујући лек који се користи у лечењу RA.

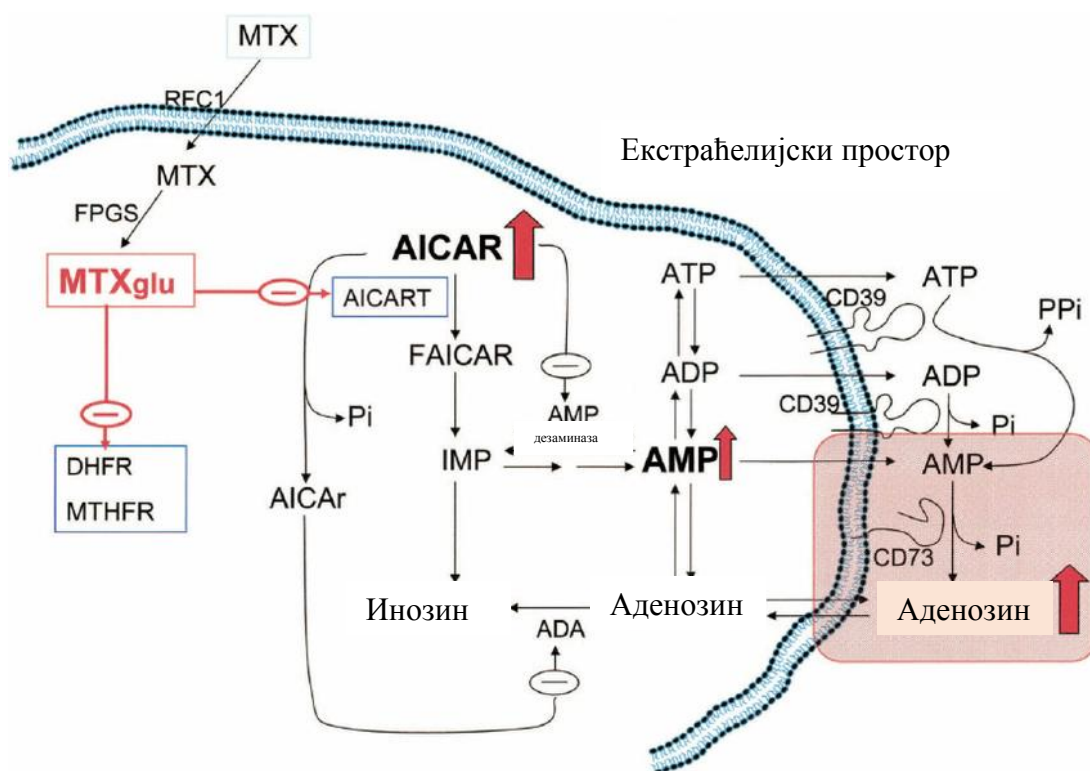
МТХ као један од најефективнијих антиреуматских лекова, између осталог, повећава концентрацију екстрацелуларног аденозина на месту инфламације, смањењем активности ADA (161, 162). Резултати наше студије потврђују чињеницу да је код болесника са касним RA који су на терапији МТХ активност ADA далеко мања у односу на болеснике без терапије МТХ. Такође, активност ADA у групи са раним RA је значајно већа у односу на групу болесника са касним RA. Ови резултати су у складу са механизмом деловања МТХ посредством метаболизма аденозина, односно инхибиције ADA. Слични резултати приказни су у студији (191) у којој је наглашено да МТХ инхибира деаминацију аденозина и потенцира аденозином индуковану вазодилатацију. Група аутора (149) је упоређујући групу која прима МТХ са групом која је без базичне терапије, показала да је активност серумске ADA код RA болесника који не примају МТХ сигнификантно већа у односу на здраве испитанике, као и да је значајно нижа код RA болесника који у терапији имају МТХ.

У нашем истраживању, у подгрупи болесника са тек постављеном дијагнозом RA није започета терапија Метотрексатом или другим болест модификујућим леком, док је подгрупа са касним RA лечена Метотрексатом просечне дозе 10,8мг недељно. Препоруке Националног водича добре клиничке праксе за реуматоидни артритис из 2013. године, јесу да почетна перорална доза метотрексата буде 15мг недељно уз постепено повећање дозе до 25мг. По овим препорукама просечна доза МТХ наших RA болесника била је ниска. Објашњење за овакав терапијски приступ нашим болесницима је у томе што је истраживање спроведено током 2011. и 2012. године када, још увек, није започето са применом нових смерница.

У раду смо забележили већу активност ксантин оксидазе код болесника са касним RA који нису лечени MTX-ом, док није било промене у активности 5'-NT и AMP дезаминазе у односу на примењени метотрексат.

У једној од студија која се бавила испитивањем активности ензима пурина у RA (137) пратећи промене активности ензима пуриног циклуса пре терапије MTX и у току MTX терапије, нису забележене промене у активности ензима пуриног циклуса након 6 недеља давања MTX. Међутим, након 48 недеља забележен је значајан пад нивоа ADA, док није било промена у 5'-NT. Такође, није уочена веза између примењене дозе MTX и активности пуринских ензима.

Према добијеним резултатима MTX доводи до значајног смањења активности ADA те на тај начин повећава хроничну акумулацију аденозина што је један од механизма његовог повољног деловања у RA. Молекуларни механизми који укључују објашњење за ефекат MTX су сложени. MTX најпре улази у ћелију, затим се у облику полиглутамата акумулира у ткивима. MTX инхибира AICAR трансформилазу доводећи до интраћелијске акумулације AICAR. Повећани AICAR нивои доводе до пораста AMP преко компетативне инхибиције AMP дезаминазе. Повећани AMP у ћелији бива премештен у екстраћелијски простор и конвертован у аденозин. Алтернативно, повишени нивои AMP могу довести до пораста нивоа ADP и/или АТР, који могу да дефосфорилишу екстраћелијски до аденозина уз помоћ CD39 и CD73. На крају, аденозин у интеракцији са својим рецептором на стимулисаној инфламаторној ћелији инхибише продукцију цитокина и смањује инфламацију. Смањење есто-5'-NT активности смањује стварање аденозина и минимизира способност MTX да смањи инфламацију. У будућности је важно одредити да ли полиморфизам CD73 гена може да одреди резистенцију на MTX код болесника код којих нема одговора на терапију (192).



Слика 10. Дејство метотрексата на концентрацију екстраћелијског аденозина- адаптирана слика преузета од Montesinos MC и cap. (192)

Показано је да МТХ доводи до повећања аденозина и тако остварује свој повољан ефекат. Али исто тако МТХ посредством полиглутамата доводи до пораста концентрације АИКАР (61). Пораст АИКАР има значајне ефекте на кључне ензиме у метаболизму пурина пре свега на инхибицију АМР дезаминазе и АДА, што доводи до пораста концентрације аденозина. Међутим, чињеница је да пораст аденозина није велики те остаје у домену активације рецептора малог афинитета, али без испољавања токсичних ефеката великих и хронично повишених концентрација аденозина (67).

Овај ефекат МТХ на супресију активности АДА приказан је и у нашем истраживању. Уједно МТХ је значајно редуковао и активност ХО што указује на његов потенцијал да повећа ресинтезу АМР и смањи проинфламатону стимулацију.

7. Закључци

1. Код болесника са реуматоидним артритисом постоје значајне промене у активности ензима укључених у метаболизам пурина, при чему се активност већине ових ензима повећава код болесника са касним реуматоидним артритисом, што указује на њихову значајну патогенетску улогу у настанку и развоју реуматоидног артритиса.
2. Карактеристичан маркер за присуство реуматоидног артритиса је повећана активност аденозин дезаминазе. Касни реуматоидни артритис се карактерише порастом активности 5'-нуклеотидазе и ксантин оксидазе, а редукцијом активности аденозин дезаминазе, у односу на рани реуматоидни артритис. Активност аденозин монофосфат дезаминазе се није показала као маркер за присуство реуматоидног артритиса нити за стадијум болести.
3. Степен клиничких манифестација није у корелацији са активношћу ензима, што може указати на њихову патогенетску везу са активацијом имунских ћелија.
4. Степен инфламације код болесника са касним реуматоидним артритисом не показује значајнију повезаност са активношћу ензима укључених у метаболизам пурина, док код болесника са раним реуматоидним артритисом постоји негативна повезаност са активношћу аденозин монофосфат дезаминазе.
5. Замор, јутарња укоченост, број болних и отечених зглобова као и активност болести показују значајну повезаност са степеном инфламације у касном и раном реуматоидном артритису. Међутим, са дужином трајања болести долази до пада функцијске способности болесника која показује најачу повезаност са брзином седиментације.
6. Поремећај метаболизма пурина и инфламација представљају независне факторе који имају значајну улогу у патогенези и клиничком испољавању реуматоидног артритиса. Метотрексат као један од лекова избора у терапији, испољава повољан терапијски ефекат на оба патогенетска механизма посредством смањења броја гранулоцита, активности аденозин дезаминазе и ксантин оксидазе у реуматоидном артритису.

8. Литература

1. Wolfe F. The natural history of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 44: 13-22.
2. Halberg P. Rheumatoid arthritis. History. In: Klippel HJ, Diepe AP, editors. *Rheumatology*, 2^d ed. London: Mosby 1998; 1.1-1.3
3. Ingegnoli F, Casteli R, Gualtierotti R. Rheumatoid factors: clinical applications. *Disease Markers* 2013; 35 (6): 727-34.
4. Gibovsky A. Epidemiology, pathophysiology and diagnosis of rheumatoid arthritis: A Synopsi. *Am J Manaq Care* 2014; 20 (7): 128-35.
5. Kuiper S, Van der Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, de Silva Ja, Van Riel PL. Influence of sex, age and menopausal status on the course of the early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1809-16.
6. Klippel HJ. Rheumatoid arthritis. Epidemiology, pathology and pathogenesis. In Klippel HJ, Weyand MC, Wortmann LR editors. *Primer on the Rheumatic Diseases* Atlanta: Arthritis Foundation 1997; 155-60.
7. Cooper NJ. Ekonomic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatology* 2000; 39: 28-33.
8. Scott LD, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376: 1094-108.
9. Zgradić I, Maličević Ž. Stillova bolest kod odraslih. U: Reumatične i srodne bolesti. Urednici Popović M, Stefanović D, Mitrović D. Vojnoizdavački zavod, Beograd 2000; 420-3.
10. Firestein GS, Panayi G, Wollheim F. Rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2007; 46: 1383.
11. Van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subset. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: 205-13.
12. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365: 2205-19.
13. Van der Heljden IM, Wilbrink B, Techetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP et al. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum* 2000; 43 (3): 593-8.
14. Wilbrink B, Holewijn M, Bijlsma JW, van Roj JL, den Otter W, van Eden W. Supression of himan cartilage proteoglycan synthesis by rheumatoid synovial fluid mononuclear cells activated with mycobacterial 60-kd heat-shock protein. *Arthritis Rheum* 1993; 36(4): 514-8.

15. Nikkari S, Luukkainen R, Mottonen T, Meurman O, Hannonen P, Skurnik M et al. Does parvovirus B19 have a role in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 1994; 53(2): 105-11.
16. Ravlić-Gulan J, Novak S, Gulan G. Patogenetski mehanizmi u reumatoidnom artritisu. *Medicina fluminensis* 2012; 48(4): 403-13.
17. Vojinović J. Imunomodulatorni i terapijski efekti primene visokih doza vitamina D3 u reumatoidnom artritisu i juvenilnom reumatoidnom artritisu. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Niš, 2001.
18. Lui ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell research* 2005; 15: 24-7.
19. Stojanović S. Značaj polimorfizma gena za TNF-alfa i metaloproteinaza u reumatoidnom artritisu. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Niš, 2012.
20. Arend WP. Physiology of citokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 45(1): 101-6.
21. Nishimoto N. Cytokine signal regulation and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 2005; 38(5): 359-67.
22. Malaviya AM. Cytokine network and its manipulation in rheumatoid arthritis. *J Assoc Physicians India* 2006; 54: 15-8.
23. Montecucco F, Mach F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Rheumatol* 2009; 48: 11-22.
24. Nashimoto N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18 (3): 277-81.
25. Canete JD, Martinez SE, Farres J, Sanmarti R, Blay M, Gomez A et al. Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(4): 263-8.
26. Choy E, Panay G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Eng J Med* 2001; 344(12): 907-16.
27. Feldmann M, Miotla J, Paleolog E, Williams R, Malfait A, Taylor P et al. Future prospects for anti-cytokine treatment. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 119-22.
28. Chan A, Filer A, Parsonage G, Kollnberger S, Gundle R, Buckley CD et al. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis Rheum* 2008; 58(3): 707-17.

29. Allard SA, Bayliss MT, Maini RN. Correlation of histopathological features of pannus with patterns of damage in different joints in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 278-83.
30. Arnett FC, Edworthy SM, Block DA. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
31. Scott DL. Early rheumatoid arthritis. *British Medical Bulletin* 2007; 81: 97-114.
32. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovitis J, Felson TD, Bingman OC et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1577-9.
33. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3433-8.
34. Cush JJ. Early rheumatoid arthritis-is there a window of opportunity? *J Rheumatol Suppl* 2007; 80: 1-7.
35. Machold KP, Stamm TA, Eberl GJ, Nell VK, Dunky A, Uffmann M et al. Very recent onset arthritis-clinical, laboratory and radiological findings during the first year of disease. *J Rheumatol* 2002; 29(11): 2278-87.
36. Klareskog L, Katarina AL, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2009; 373: 659-72.
37. Jansen LMA, van der Horst-Bruinsma, van der Schaardenburg. Predictor of radiographic joint damage in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 924-7.
38. Smolen JS, Aletaha D. Patients with rheumatoid arthritis in clinical care. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 221-5.
39. Ory PA. Interpreting radiographic data in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 597-604.
40. Sommer OJ, Kladosek A, Weiler V, Czembirek H, Boeck M and Stiskal M. Rheumatoid arthritis: a practical guide to state-of-the-art imaging, image interpretation, and clinical implication. *RadioGraphics* 2005; 25: 381-98.
41. Ostergaard M, Peterfy C, Conaghan P, McQueen F, Bird P, Ejbjerg B et al. OMERCAT Rheumatoid Arthritis Magnetic Resonance Imaging Studies. Core set of MRI acquisitions, joint pathology definitions and the OMERACT RA-MRI scoring system. *J Rheumatol* 2003; 30: 1385-6.
42. Sewerin P, Buchbender C, Vordenbaumen S, Scherer A, Miese F, Brinks R et al. Advantages of a combined rheumatoid arthritis magnetic resonance imaging score

- (RAMRIS) for hand and feet: does the RAMRIS of the hand alone underestimate disease activity and progression? *BMS Musculoskeletal Disorders* 2014; 15:104.
43. Sokka T, Krishnan E, Hakkinen A et Hannonen P. Functional disability in rheumatoid arthritis patients compared with a community population in Finland. *Arthritis Rheum* 2003; 48(1): 59-63.
44. Van der Heijde D. Impact of rheumatoid arthritis on physical function during the first five years. No longer a question mark? *Rheumatology* 2000; 39: 579-80.
45. Branković S. Ispitivanje funkcijske sposobnosti i kvaliteta života bolesnika sa hroničnim artritisom. *Acta Rheum Belgrad* 2006; 36(1): 29-34.
46. Bruce B and Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: a review of its history, issues, progress and documentation. *The journal of Rheumatology* 2003; 30:1.
47. Bruce B and Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. *Health Qual Life Outcomes* 2003; 1:20.
48. Kirwon JR, Michell K, Hewlett S, Hehir M, Pollock J, Memel D and Bennett B. Clinical and psychological outcome from a randomized controlled trial of patient-initiated direct-access hospital follow-up for rheumatoid arthritis extended to 4 years. *Rheumatology* 2003; 42: 422-6.
49. American College of Rheumatology, Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 328-46.
50. Stucki G. Understanding disability. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 289-90.
51. Katz P and Morris A. Time use patterns among women with rheumatoid arthritis: association with functional limitations and psychological status. *Rheumatology* 2007; 46: 490-5.
52. Welsing PMJ, Gastel AM, Swinkels HL, Kiemeny LAM and Riel PLCM. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2009-17.
53. Sokka T, Kankainen A and Hannonen P. Scores for functional disability in patients with rheumatoid arthritis are correlated at higher levels with pain scores than with radiographic scores. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 386-9.
54. Tanaka E, Mannalithara A, Inoue E et al. Efficient management of rheumatoid arthritis significantly reduces long-term functional disability. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1153-8.
55. Breedveld FC, Han C, Bala M, Heijde D, Baker D, Kavanaugh AF, Maini RN and Lipsky PE. Association between baseline radiographic damage and improvement in physical function after treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 52-5.

56. Goldblatt F and Isenberg DA. New therapies for rheumatoid arthritis. *Cli Exp Immunol* 2005; 140(2): 195-204.
57. Damjanov N, Vojinović J. Biološko lečenje reumatoidnog artritisa. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 2009; 137(3-4): 205-10.
58. Smolen JS, Landewe R, Breedveld F, Dougados M, Emerz P, Gaujoux VC et al. EULAR recommendation for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 964-75.
59. Cronstein BN. Going with the flow: methotrexate, adenosine, and blood flow. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 421-2.
60. Tian HT and Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007; 65(3):168-73.
61. Swierkot J and Szechinski J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 473-92.
62. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 163-72.
63. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull NYU Hos J Dis* 2007; 65(3): 168-73.
64. Kocić G. Enzimi purinskog ciklusa u uslovima delovanja antimetabolita i stimulisano rasta. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Niš, 1993.
65. Murray AW. The biological significance of purine salvage. *Ann Rev Biochem* 1971; 40: 811-26.
66. Jurecka A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 242-63.
67. Chan ESL, Fernandez P, Cronstein BN. Adenosine in inflammatory joint diseases. *Purinergic Signalling* 2007; 3: 145-52.
68. Iwaki-Egawa S, Yamamoto T, Watanabe Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. *Biol Chem.* 2006; 387: 319–21.
69. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 7 (9): 759–70.
70. Sang-Heon K, Yoon-Keun K, Heung Woo P et al. Adenosine deaminase and adenosine receptor polymorphism in aspirin-intolerant asthma. *Resp Med* 2008; 1-8.
71. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25:33-9.

72. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4): 527-52.
73. Moncrieffe H, et al. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J Immunol* 2010;185:134–143.
74. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 2013; 19(6): 355-67.
75. Cronstein BN, Levin RI, Philips M et al. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol* 1992; 148: 2159-62.
76. Tompson L. 5'-Nucleotidase-an overview of the last three years. In: Harness et al. (eds) *Purine and pyrimidine metabolism in man VII, part B*. Plenum Press 1991; 145-50.
77. Sunderman FW. The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase. *Ann Clin Lab Sci* 1990; 20: 123-39.
78. Tompson LF, Ruedi JM. Synthesis of immunoglobulin G by pokeweed mitogen- or Epstein Barr virus stimulated human B cells. In vitro is restricted to the ecto-5'-nucleotidase positive subset. *J Clin Invest* 1988; 82: 902-5.
79. Kendall MJ, Bold AM, Farr M and Hawkins CF. 5' nucleotidase in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid disease. *Lancet* 1971; 2: 1012-3.
80. West M, Poske RM, Black AB, Pilz CG, Zimmerman HJ. Enzyme activity in synovial fluid. *J Lab Clin Med* 1963; 62(2): 175-83.
81. Farr M, Kendall MJ, Shuttleworth R, Meynell MJ and Hawkins CF. Source and significance of 5' nucleotidase in synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1973; 32:326-30.
82. Thompson PW, Houghton BJ, Clifford C, Jones DD, Whitaker KB and Moss DV. The source and significance of raised serum enzymes in rheumatoid arthritis. *Q J Med* 1990; 76: 869-79.
83. Winder WW. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Applied Physiol* 2001;91(3): 1017-28.
84. Hancock CR, Brault JJ, Terjung RI. Protecting the cellular energy state during contractions: role of AMP deaminase. *J Phys and Pharm* 2006; 57: 17-29.
85. Dzeja P, Terzic A. Adenylate Kinase and AMP Signaling Networks: Metabolic Monitoring, Signal Communication and Body Energy Sensing. *Int. J.Mol. Sci.* 2009; 10: 1729-72.

86. Graham E, Spooner RJ, Goldberg DM. Automated kinetic assays for routine determination of adenosine deaminase and guanase activities of human serum. *Clin Chim Acta* 1973; 47: 75-87.
87. Andy RJ, Kornfeld R. Biosynthesis of the adenosine deaminase –binding protein in human fibroblast and hepatoma cells. *J Biol Chem* 1984; 259: 9832-9.
88. Van der Weyden M, Kelley W. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. *J Biol Chem* 1976; 251: 5448-56.
89. Spencer N, Hopkinson DA, Harris H. Adenosine deaminase polymorphism in man. *Ann Hum Genet* 1968; 32: 9-15.
90. Centelles JJ, Franco R. Is adenosine deaminase involved in adenosine transport? *Med Hypothesis* 1990; 33: 245-50.
91. Franko R, Valenzuela A, Luis C et al. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto adenosine-deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 1998; 161: 27-42.
92. Pacheco R, Martinez NJM, Lejeune M et al. CD26, adenosine deaminase and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9583-8.
93. Eltzsching HK, Faigle M, Knapp S and al. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* 2006; 108: 1602 - 10.
94. Gines S, Marino M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebauts et al. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J* 2002; 361: 203-9.
95. Blanco J, Valenzuela A, Herrera C et al. The HIV-1 gp120 inhibits the binding of adenosine deaminase to CD26 by a mechanism modulated by CD4 and CXCR4 expression. *FEBS Lett.* 2000; 477: 123-8.
96. Valenzuela A, Blanco J, Callebaut C et al. Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles. *J Immunol* 1997; 158: 3721-9.
97. Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J* 1996; 9:632-3.
98. Surekha Rani H, Madhavi G, Srikanth BMV, Jharna P, Rao UR and Jyothy A. Serum ADA and C-reactive protein in rheumatoid arthritis. *Int J Hum Genet* 2006; 6 (3): 195-8.
99. Wessels J, Kooloos WM, de Jonge R, Jeska K, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF et al. Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate

- treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* 2006; 54: 2830-9.
100. Hitoglou S, Hatzistilianou M, Gougoustamou D, Athanassiadou F, Kotis A. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2001; 20: (6): 411-6.
101. Pacher P, Nivorozhkin A and Szabo C. Therapeutic Effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* 2006; 58(1): 87-114.
102. Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev* 2004; 36:363-75.
103. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002;33: 774-97.
104. Wiezorek JS, Brown DH, Kupperman DE and Brass CA. Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia. *J Clin Invest* 1994; 94(6): 2224-30.
105. George J and Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5(1):265-72.
106. George J and Struthers AD. The role of urate and xanthine oxidase inhibitors in cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther* 2008; 26(1): 59-64.
107. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Vizioli L and Muscari A. Relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction and cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *J Cardiol* 2012; 59(3): 235-42.
108. Nashino T, Okamoto K. Mechanistic insights into xanthine oxidoreductase from development studies of candidate drugs to treat hyperuricemia and gout. *J Biol Inorg Chem* 2015; 20 (2): 195-207.
109. Miesel R and Zuber M. Elevated levels of xanthine oxidase of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation* 1993; 17 (5): 551-61.
110. Hanachi N, Charef N, Baqhiani A, Khennouf S, Derradji Y, Boumerfeq S and al. Comparison of xanthine oxidase levels in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. *Saudi Med J* 2009; 30(11): 1422-5.
111. Arrar L, Hanachi N, Rouba K, Charef N, Khennouf S and Baqhiani A. Anti-xanthine oxidase antibodies in sera and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. *Saudi Med J* 2008; 29 (6): 803-7.

112. Al-Muhtaseb, Al-Kaissi E, Thawaini AJ, Eldeen ZM, Al-Muhtaseb S, Al-saleh B. The role of human xathine oxidoreductase (HXOR), anti-HXOR antibodies, and microorganisms in synovial fluid of patients with joint inflammation. *Rheumatol Int* 2012; 32(8): 2355-62.
113. Yossif AM, Ibrahim TM, Salem HA, Gamil NM and sayed LM. Effects of high lipid diet and allopurinom on the development of experimentally induced arthritis in rats. *Pharmacology* 1995; 51: 160-4.
114. Battelli MG, Bolognesi A, Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(9): 1502-17.
115. Hirschhorn R. Complete and partial adenosine deaminase deficiency. Relationship of immune function to metabolite concentration, enzyme activity and effects of therapy. *Ann of the New York Academy of sciens* 2006; 451 (1): 20-5.
116. Vinapamula KS, Pemmaraju SV, Bhattaram SK, Bitla AR, manohar SM. Serum adenosine deaminase as inflammatory marker in rheumatoid arthritis. *J Clin Diagn Res* 2015; 9 (9): 8-10.
117. Pacheco R, Martinez-Navio J, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM et al. CD-26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *PNAS* 2005; 102 (27): 9583-8.
118. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994; 76(1): 5-13.
119. Barletta KE, Ley K, Mehrad B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Atheroscler Thromb vasc Biol* 2012; 32(4): 856-64.
120. Aldrich MB, Blackburn MR, Kellems RE. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272(2): 311-5.
121. Bachadahi I, Bushell A, Beck S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 41(1): 176-84.
122. Barletta KE, Ley K and Mehrad B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(4): 856-64.
123. Linden J. The role of adenosine in response to vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 843-4.
124. Varani K, Padovan M, Govoni M, Vincenzi F, Trotta F, Borea PA. The role of adenosine receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2010; 10 (2): 61-4.

125. Varani P, Padovan M, Vincezi F, Targa M, Trotta F, Govoni M et al. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arth Res Ther* 2011; 13: (6): R 197.
126. Hasko G, Pacher P, Deitch EA, Vizi ES. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol Ther* 2007; 113(2): 264-75.
127. Hasko G, Pacher P. Regulation of macrophage function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(4): 865-9.
128. Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Settimo FD, Natale G et al. Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322(2): 435-42.
129. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targ* 2012; 13(6): 842-62.
130. Arnett FC, Edworthy SM, Block DA. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-324.
131. Bruce B and Fries JF. The Stanford Health Assessment Questionnaire: dimensions and practical applications. *Health Qual Life Outcomes* 2003; 1:20.
132. Fransen J, Stucki G and Van Riel P.L.C.M. Rheumatoid arthritis measures. *Arthritis Rheum* 2003; 49(5): 214-24.
133. Larsen A, Dale K Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn* 1977; 18: 481-9.
134. Wood RJ, Williams DG. Colorimetric determination of serum 5'-nucleotidase without deproteinisation. *ClinChem* 1981; 27: 464-5.
135. Pederson RC, Berry AJ. Sensitive, optimised assay for serum AMP deaminase. *Clin Chem* 1977; 23: 1726-33.
136. Kizaki H, Sakurada T. Simple micro assay methods for enzymes of purine metabolism. *J Lab Clin Med* 1977;89: 1135-44.
137. Van Ede AE, RFJM Laan, RA De Abreu, ABJ Stegeman, LVA van de Putte. Purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 1060-4.
138. Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2014; 16(2): 1-7.

139. Suqiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, Kumaqai S. Impact of smoking as risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(1):70-81.
140. Stolk JN, Boerbooms AM, De Abreu RA, Kerstens PJ, De Koning DG, De Graaf R et al. Purine enzyme activities in recent onset rheumatoid arthritis: are there differences between patients and healthy controls? *Ann Rheum Dis* 1996; 55(10): 733-8.
141. Henderson B, Johnstone JJ, Chayen J. 5' nucleotidase activity in the human synovial lining in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1980; 39(3): 248-52.
142. Johnson SM, Patel S, Bruckner FE and Collins DA. 5'-nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; 38: 391-6.
143. Wortmann RL, Veum JA and Rachow JW. Synovial fluid 5'-nucleotidase activity. Relationship to other purine catabolic enzymes and to arthropathies associated with calcium crystal deposition. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1014-20.
144. Zakeri Z, Izadi S, Niazi A et al. Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med* 2012; 5(2): 195-200.
145. Nalesnik M, Mehanović-Nikolić J, Jandrić S. Adenosine deaminase and C-reactive protein in diagnosing and monitoring of rheumatoid arthritis. *Med Glas* 2011; 8(1): 163-8.
146. Yuksel H, Akoglu TF. Serum and synovial fluid adenosine deaminase activity in patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 1988; 47: 492-5.
147. Pallinti V, Ganesan N, Anbazhagan M and Rajasekhar G. Serum biochemical markers in rheumatoid arthritis. *Indian J Biochem Biophys*. 2009; 46(4): 342-4.
148. Sari RA, Taysi S, Yilmaz O and Bakan N. Correlation of serum levels of adenosine deaminase activity and its isoenzymes with disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003; 21(1): 87-90.
149. Salesi M, Ghavzini RA, Farajzadegan Z, Karimifar M, Karimzadeh H, Masoumi M et al. Serum adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. *J Res Pharm Pract* 2012; 1(2): 72-6.
150. Zamani B, Jamali R, Jamali A. Serum adenosine deaminase may predict disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012; 32(7): 1967-75.
151. Erer B, Yilmaz G, Yilmaz FM, Koklu S. Assessment of adenosine deaminase levels in rheumatoid arthritis patients receiving anti-TNF-alpha therapy. *Rheumatol Int* 2009; 29(6): 651-4.

152. Cordero OJ, Salgado FJ, Mera-Varela A et al. Serum interleukin-12, interleukin-15, soluble CD26 and adenosine deaminase in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2001; 21(2): 69-74.
153. Demir G, Borman P, Ayhan F, Ozquin T, Kayqisiz F, Yilmez G. Serum adenosine deaminase level is high but not related with disease activity parameters in patients with rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol* 2014; 8: 24-8.
154. Branković S. Ispitivanje funkcijske sposobnosti i kvaliteta života bolesnika sa hroničnim artritismom. *Acta Rheum Belgrad* 2006; 36(1): 29-34.
155. Oken O, Batur G, Gunduz R, Yorgancioglu RZ. Factors associated with functional disability in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2008; 29(2): 163-6.
156. Schneeberger E, Gustavo C, Cocco M, Salcedo M, Chiardola F, Rosemffet M et al. Factors associated with disability in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2010; 16 (5): 215-8.
157. Toussiot E. Predictive factors for disability as evaluated by the Health Assessment Questionnaire in rheumatoid arthritis: a literature review. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010; 9(1): 51-9.
158. Tanka E, Manalithara A, Inoue E. Efficient management of rheumatoid arthritis significantly reduces long-term functional disability. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1153-8.
159. Ernest SH, Choy MD and Panazyl GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-16.
160. Cem Gabay. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 (Suppl 2): 53.
161. Mehanović Nikolić J, Laloš Miljuš J, Nalesnik M, Lakić LJ, Bobić Ž, Bogdanić J at al. The diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, adenosine deaminase activity and other potential biomarkers for predicting and monitoring rheumatoid arthritis. *JMB* 2008; 27(3): 383-8.
162. Nakamachi Y, Koshiba M, Nakazawa T, Hatachi S, Saura R, Kurosaka M et al. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003; 48(3): 668-74.
163. Da Mota LM, Santos neto LL, De Carvaliho JF. Autoantibodies and other serological markers in rheumatoid arthritis: predictors of disease activity? *Clin Rheumatol* 2009; 28 (10): 1127-34.
164. Ohta A, Sitkovsky M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol* 2014; 5: 304.

165. Chan ES, Fernandez P, Cronstein BN. Adenosine in inflammatory joint diseases. *Purinergic Signal* 2007;3:145–52.
166. Nikolaus S, Bode C, Taal E, van de Laar M. Four different patterns of fatigue in rheumatoid arthritis patients: results of a Q-sort study. *Rheumatology* 2010; 49(11): 2191-9.
167. Hoogmoed D, Fransen J, Bleijenberg G, van Riel P. Physical and psychological correlates of severe fatigue in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2010; 49(7): 1294-302.
168. Bergman MJ, Shahouri SH, Shaver TS, Anderson JD, Weidensaul DN, Busch RE et al. Is fatigue an inflammatory variable in rheumatoid arthritis? Analyses of fatigue in RA, osteoarthritis and fibromyalgia. *J Rheumatol* 2009; 36(12): 2788-94.
169. Pollard LC, Choy EH, Gonzales J, Khoshaba M and Scott DL. Fatigue in rheumatoid arthritis reflects pain, not disease activity. *Rheumatology* 2006; 45(7): 885-9.
170. Nicassio PM, Ormseth SR, Custodio MK, Irwin MR, Olmstead R, Weisman MH. A multidimensional model of fatigue in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2012; 39(9): 1807-13.
171. Van Tuyl LH, Lems WF, Boers M. Measurement of stiffness in patients with rheumatoid arthritis in low disease activity or remission: a systemic review. *BMS Musculoskelet Disord* 2014; 15: 28.
172. Khan NA, Yazici Y, Calvo-Alen J, Dadonien J, Gossec L, Hansen TM et al. Reevaluation of the role of duration of morning stiffness in the assessment of rheumatoid arthritis activity. *J Rheumatol* 2009; 36(11): 2435-42.
173. Kirwan JR, Buttgerit F. Symptom control with low-dose glucocorticoid therapy for rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2012; 51(4): 14-20.
174. Nasim AK, Yazici Y, Calvo-Alen J, Dadonien J, Gossec L, Hansen TM et al. Reevaluation of the role of duration of morning stiffness in the assessment of rheumatoid arthritis activity. *J Rheumatol* 2009; 36(11): 2435-42.
175. Pincus t, Sokka T. Laboratory tests to assess patients with rheumatoid arthritis: advantages and limitations. *Rheum Dis Clin North Am* 2009; 35(4): 731-4.
176. Petrović-Rackov LJ, Pejnović N, Miljušković Z, Ercegović G. Inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Jug Med Biochem* 2004; 23(4): 375-80.
177. Rhodes B, Furnrohr BG, Vyse TJ. C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 282-9.
178. Ammitsbell CG, Steffensen R, Bogsted M, Petersen KH, Hetland ML, Junker P et al. CRP genotype and haplotype associations with serum C-reactive protein level and DAS28 in untreated early rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2014; 16(5): 475.

179. Dessein PH, Joffe BI and Stanwix AE. High sensitive C-reactive protein as a disease activity marker in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31:1095-7.
180. Skogh T, Gustafsson D, Kjellberg M and Husberg M. Twenty eight joint count disease activity score in recent onset rheumatoid arthritis using C reactive protein instead of erythrocyte sedimentation rate. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 681-2.
181. Shrivatsva AK, Pandey A. Inflammation and rheumatoid arthritis. *J Physiol Biochem* 2013; 69 (2): 335-47.
182. Wilson A, Yu Hsing-Ting, Goodnough LT, Nissenson AR. Prevalence and outcomes of anemia in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004; 116 (7): 50-7.
183. Singh U, Vishwanath A, Verma PK, Singh NK, Shukla RC, Singh S et al. Is rheumatoid factor still a superior test for the diagnosis of rheumatoid arthritis? *Rheumatol Int* 2010; 30(8): 1115-9.
184. Odegard S, Finset A, Mowinckel P, Kvien TK, Uhlig T. Pain and psychological health status over 10-year period in patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1195-201.
185. Reese JB, Somers TJ, Keefe F, Mosley-Williams A, Lumley MA. Pain and functioning of rheumatoid arthritis patients based on marital status: is a distressed marriage preferable to no marriage? *J Pain* 2012; 11: 958-64.
186. Inanc N, Yilmaz-Oner S, Can M, Sokka T, Direskeneli H. The role of depression, anxiety, fatigue and fibromyalgia on the evaluation of the remission status in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2014; 41(9): 1755-60.
187. Nicassio PM, Ormseth SR, Kay M, Custodio M, Irwin MR, Olmstead et al. The contribution of pain and depression to self-reported sleep disturbance in patients with rheumatoid arthritis. *Pain* 2012; 153: 107-12.
188. Lee YC. Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15(1): 300-5.
189. Proudman SM, Conaghan PG, Richardson C, Griffiths B, Green MJ, McGonagle D et al. Treatment of poor-prognosis early rheumatoid arthritis. A randomized study of treatment with methotrexate, cyclosporin A, and intraarticular corticosteroids compared with sulfasalazine alone. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1809-19.
190. Dougados M, Pensec VD, Ferlet JF, Joulin SJ, Agostino MA, Backhaus M et al. The ability of synovitis to predict structural damage in rheumatoid arthritis: a comparative study between clinical examination and ultrasound. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 665-71.

191. Riksen NP, Barrera P, Van den Broek PHH, Van Riel PL, Smits P. Methotrexate modulates the kinetics of adenosine in humans in vivo. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 465-70.
192. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernandez P, Cronstein BN. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5-nucleotidase. *Arthritis Rheum* 2007; 56(5): 1440-5.

Прилог 1

Упитник о процени здравственог стања (Health Assessment Questionnaire-HAQ)

Заокружите један од понуђених одговора који најбоље описује вашу способност да обављате уобичајене активности у току протекле недеље:

без проблема	са потешкоћама	са много потешкоћа	не могу
-----------------	-------------------	-----------------------	---------

ОБЛАЧЕЊЕ И ЛИЧНА НЕГА

Можете ли да:

-се сами обучете укључујући и везивање пертли и закопчавање дугмади?	___	___	___	___
--	-----	-----	-----	-----

-сами оперете косу?	___	___	___	___
---------------------	-----	-----	-----	-----

УСТАЈАЊЕ

Можете ли да:

-устанете са столице без наслона за руке?	___	___	___	___
---	-----	-----	-----	-----

-легнете или устанете из кревета?	___	___	___	___
-----------------------------------	-----	-----	-----	-----

ИСХРАНА

Можете ли да:

-сечете месо?	___	___	___	___
---------------	-----	-----	-----	-----

-подигнете пуну шољу или чашу до уста?	___	___	___	___
--	-----	-----	-----	-----

-отворите ново паковање млека?	___	___	___	___
--------------------------------	-----	-----	-----	-----

ХОДАЊЕ

Можете ли да:

-ходате напољу по равној подлози?	___	___	___	___
-----------------------------------	-----	-----	-----	-----

-се попнете уз пет степеника?	___	___	___	___
-------------------------------	-----	-----	-----	-----

Заокружите било које од ПОМАГАЛА ИЛИ НАПРАВА које обично користите за наведене активности:

___ штап	___ помагала за облачење
___ рам за ходање	___ посебна или за вас направљена помагала
___ штаке	___ посебна или за вас направљена столица
___ инвалидска колица	___ друго (опишите: _____)

Заокружите радње у којима вам обично ПОМАЖУ ДРУГЕ ОСОБЕ:

___облачење и лична нега ___исхрана

___устајање ___ходање

ЛИЧНА ХИГИЈЕНА

Можете ли да:

-оперете и обришете цело тело? ___

-се сами окупате? ___

-седнете и устанете са WC шоље? ___

ДОХВАТАЊЕ ПРЕДМЕТА

Можете ли да:

-дохватите и спустите предмет тежине 2,5кг(нпр.кесу шећера)
који је непосредно изнад ваше главе? ___

-се сагнете и дохватите одећу са пода? ___

ХВАТАЊЕ

Можете ли да:

-отворите врата од аутомобила? ___

-отворите већ отворене тегле? ___

-одврћете и заврћете славине? ___

АКТИВНОСТИ

Можете ли да:

-завршавате ситне обавезе ван куће
и идете у куповину? ___

-улазите и излазите из аутомобила? ___

-се бавите кућним пословима, усисавате
или радите у башти? ___

Заокружите било које од наведених ПОМАГАЛА ИЛИ НАПРАВА које обично користите за наведене активности:

___издигнуто седиште WC шоље ___шипка за придржавање у кади

___седиште за каду ___помагала за дохватање предмета са
продуженом дршком

___отварач за тегле (које су већ отворене) ___помагала са продуженом дршком за
купатило

___друго (опишите: _____)

Заокружите радње у којима вам обично ПОМАЖУ ДРУГЕ ОСОБЕ:

___лична хигијена

___хватање и отварање предмета

___дохватање предмета

___завршавање ситних обавеза и домаћи
послови

Прилог 2

Скраћенице

ACPA	антицитрулинска протеинска антитела
ACR	American Collage of Rheumatology
ADA	аденозин дезаминаза
ADA bp	аденозин дезаминаза везујући протеин
ADP	аденозин дифосфат
AICAR	амино-имидазол карбоксамид рибозил-5-фосфат
AMP	аденозин монофосфат
ATP	аденозин трифосфат
cAMP	циклични аденозин монофосфат
CRP	C-реактивни протеин
DAS28	disease activity score
DMARD	Disease modifying anti-rheumatic drugs
EBV	Epstein-Barr вирус
ELISA	Enzyme Liked Immunosorbent Assay
EULAR	The European League Against Rheumatism
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HLA	Human Leucocyte Antigen
Ig	имуноглобулин
IFN γ	интерферон гама
IL	интерлеукин
IMP	инозин монофосфат
MHC	Major Histocompatibility Complex (главни хистокompatibilни комплекс)
MR	магнетна резонанца
MTX	Methotrexate
NSAID	нестероидни антиинфламаторни лекови
PMN	полиморфонуклеари

RA	реуматоидни артритис
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (рецепторски активатор за нукларни фактор капа бета лиганд)
RANTES	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
RF	реуматоидни фактор
SE	брзина седиментације еритроцита
SF	синовијски фибробласт
TGF β	Transforming Growth Factor beta (трансформишући фактор раста бета)
TNF- α	Tumor necrosis factor-alfa (фактор некрозе тумора алфа)
TCR	T ћелијски рецептор
UZ	ultrazvuk

Биографија аутора

Нела Живковић је рођена 4.12.1977. године у Нишу. Основну школу и гимназију завршила је у Нишу као одличан ученик. Медицински факултет у Нишу, студијска група медицина, уписала је школске 1996/97 године и дипломирала 2003. године са просечном оценом 8,45 и положеним дипломским испитом са оценом 10. Последипломске студије из реуматологије уписала је школске 2003/2004 године на истом факултету, и одбранила магистарску тезу "Утицај активности болести и зглобног оштећења на функционалну способност болесника са реуматоидним артритисом" 2009. године.

Обавезни лекарски стаж обавила је у Клиничком Центру у Нишу и положила државни испит октобра 2004. године. Период септембра 2005. године до октобра 2007. године је провела на болничком одељењу за реуматологију Института Нишка Бања у својству магистранта. Током 2008. године радила у Дому здравља Ражањ на пословима хитног збрињавања и пружања општих медицинских услуга. Од септембра 2012. до септембра 2014. године била је на стручном усавршавању на Клиници за реуматологију Института Нишка Бања. Од маја 2015. године је на специјализацији из педијатрије.

Учесник је Европске школе онкологије- The European School of Oncology-Breast Cancer Screening- одржане у Нишу 2005. године.

Завршила је школу комуникације "Човек човеку", Завода за трансфузију крви Ниш и Црвеног крста Србије и стекла звање "едуковани волонтер-сарадник у давалаштву крви".

Похађала је интернационалну школу остеопорозе-IOF Osteoporosis Diagnosis Course with Densitometry-и положила сертификациони испит 2007. године.

2013- завршила курс "BLS-AED, ALS-малигни ритмови, дисајни пут, i.v. приступ и принципи рада у тиму"

2014- завршила курс "2nd South-East Europe (SEE) Course in Adult and Pediatric Rheumatology"

Учесник је бројних семинара, конгреса и континуираних едукација.

Служи се енглеским језиком- завршен виши средњи курс енглеског језика.

Завршила је школу за коришћење MS windows 2000, MS Office 2003, Corel Draw 12 и основе интернета у пројекту амбасаде Краљевине Норвешке у Србији и Црној Гори.

Волонтер је Црвеног крста од 2002. године.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Патофизиолошки аспекти поремећаја метаболизма пурина у реуматичном артритису.

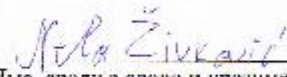
која је одбрањена на ... факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, писам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:


(Име, средње слово и презиме)
Др Нела К. Живковић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: **Патофизиолошки аспекти поремећаја метаболизма пурина у
реуматичном артритису**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам
предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан
штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:


(Име, средње слово и презиме)
Др Мела К. Живковић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Патофизиолошки аспекти поремећаја метаболизма пурина у реуматичном артритису

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, готовом за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унесу у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

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

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Мела Ђивковић
(Име, средње слово и презиме)
Др Мела К. Живковић