Povezanost prosječnog volumena limfocita i monocita s aktivnošću bolesti kod reumatoidnog artritisa

Sekelj, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:606301

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sara Sekelj

Povezanost prosječnog volumena limfocita i monocita s aktivnošću bolesti kod reumatoidnog artritisa

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Hematologija 1 Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb pod stručnim vodstvom prof.dr.sc. Renate Zadro.

„Duboko vjeruj u ono što želiš i zapamti: izgubljeno je samo ono čega se odreknemo!“

Hvala mojoj obitelji i prijateljima za svu podršku i ljubav tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. HEMATOPOEZNI SUSTAV 2

1.1.1. Monociti 2

1.1.2. Limfociti 3

1.2. IMUNOSNI SUSTAV 4

1.2.1. Upala 4

1.2.2. Autoimunost 7

1.3. REUMATOIDNI ARTRITIS 8

1.3.1. Etiologija i patogeneza 8

1.3.2. Dijagnostika 11

1.3.3. Praćenje aktivnosti bolesti 13

1.3.4. Farmakološko liječenje 14

2. OBRAZLOŽENJE TEME 19

3. MATERIJALI I METODE 20

3.1. ISPITANICI I UZORCI 20

3.2. METODE 21

3.2.1. Kompletna krvna slika 21

3.2.2. Brzina sedimentacije eritrocita 24

3.2.3. C-reaktivni protein 24

3.2.4. DAS (engl. Disease Activity Score) 24

3.3. STATISTIČKA ANALIZA 25

4. REZULTATI I RASPRAVA 27

4.1. REZULTATI 27

4.1.1. Deskriptivna statistika 27

4.1.2. Ovisnost prosječnog volumena limfocita o stadiju RA 28

4.1.3. Ovisnost prosječnog volumena monocita o stadiju RA 29

4.1.4. Dijagnostička specifičnost i osjetljivost 29

4.1.5. Korelacija MCV Ly i MCV Mo s CRP i DAS28 31

4.1.6. Usporedba rezultata mjerenja ovisno o vrsti bioloških lijekova 34

4.2. RASPRAVA 36

5. ZAKLJUČCI 38

6. LITERATURA 39

7. SAŽETAK / SUMMARY 41

1. UVOD

Reumatoidni artritis (RA) sistemska je autoimuna bolest koja prvenstveno napada sinoviju, membranu vezivnog tkiva koja oblaže šupljinu unutar zgloba i luči sinovijalnu tekućinu. Od ove bolesti boluje preko 3 milijuna ljudi u Europi te 21 milijun u svijetu. Češći je u žena i pogađa sve dobne skupine. Točan uzrok pojave reumatoidnog artritisa je nepoznat, ali uključuje djelovanje vanjskih čimbenika, mikroorganizama te poremećaja u imunosnom sustavu domaćina. Bolest počinje uz određene opće simptome: umor, malaksalost, blago povišena tjelesna temperatura, bol i zakočenje zglobova. Tipično je jutarnje zakočenje koje traje dugo, otprilike sat vremena nakon buđenja. Zglobovi su najčešće zahvaćeni simetrično, postaju osjetljivi, otečeni te se razvijaju deformiteti poput ulnarne devijacije prstiju (http://www.msd-prirucnici.placebo.hr).

Brojna istraživanja na području reumatoidnog artritisa te općenito autoimunih i upalnih procesa omogućavaju bolje razumijevanje patologije same bolesti, uočeni su novi putevi aktivacije upalnog procesa te utvrđene nove mete lijekova, rezultat čega je biološka terapija. S obzirom na prirodu ove bolesti, cilj svake terapije je postizanje remisije, smanjenje upale i poboljšanje funkcije zglobova.

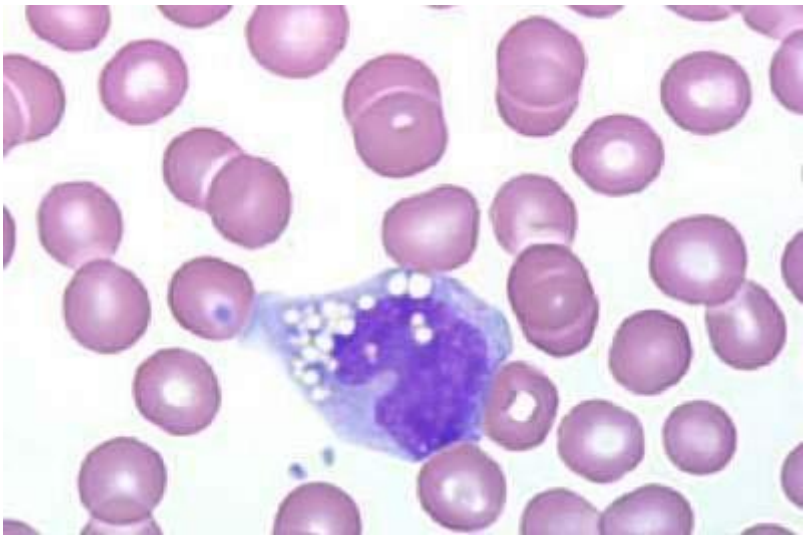
Bitan faktor u liječenju bilo koje bolesti, pa tako i reumatoidnog artritisa, je rana dijagnostika, što je s obzirom na opće simptome jako teško izvedivo. Period od 12 tjedana unutar pojave prvih simptoma smatra se vrlo ranom dijagnostikom te je veća vjerojatnost postizanja remisije uvođenjem terapije u tom periodu (Ćurković, 2007). Danas se naglasak stavlja na definiranje novih ciljeva liječenja kao i predviđanje učinka terapije kako bi se ona pravodobno mogla promijeniti ili modificirati. Postoji nekoliko biljega uz pomoć kojih se dijagnosticira i procjenjuje aktivnost ove bolesti kao što su reumatoidni faktor, anti-perinuklearni faktor, anti-keratinska protutijela te citrulinirani vimentin, uz ostale dijagnostičke metode.

S obzirom da je reumatoidni artritis upalna autoimuna bolest, u patologiju procesa uključene su brojne stanice. Ipak, najvažniju ulogu imaju upravo stanice hematopoeznog sustava, poglavito limfociti kao glavni proizvođači autoantitijela, uz ostale stanice koje brane organizam od upalnih procesa kao što su neutrofilni granulociti ili monociti (Suresh i sur., 2016)

1.1. Hematopoezni sustav

1.1.1. Monociti

Leukociti se prema funkciji dijele na dvije skupine: fagocite i stanice imunosnog sustava. U skupinu fagocita ubrajamo monocite i granulocite. Monociti su stanice koje su dio mononuklearno-fagocitnog sustava, a osnovna uloga im je upravo fagocitoza. Nastaju u koštanoj srži iz matičnih hematopoeznih stanica, a diferencijacija i sazrijevanje traju otprilike 50-60 sati. Iz monoblasta nastaju promonociti, a zatim sami monociti. Promonociti su stanice veličine od 14 do 20 μm, s bazofilnom citoplazmom i režnjatom jezgrom. Monociti su stanice s velikim varijacijama u veličini. Jedan monocit otprilike ima promjer od 10 do 21 μm, s plavo-sivom citoplazmom koja je veličinom s jezgrom u omjeru 1:1 (slika 1.) (Labar i Hauptman, 2007).



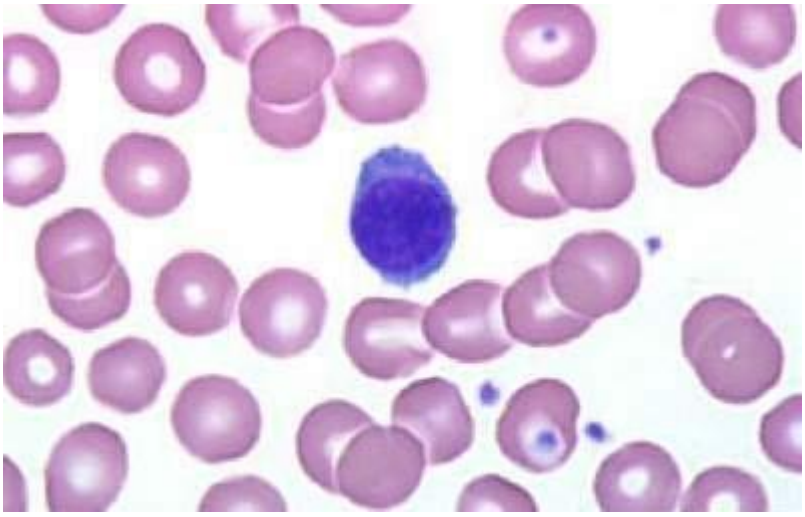
Slika 1: Mikroskopski prikaz monocita u razmazu periferne krvi bojanom po Pappenheimu (http://labmed.hallym.ac.kr/hematol/Normal-PBcells.htm, pristupljeno 01.07.2016.)

Monociti sadrže primarne i sekundarne granule. Primarne granule sadrže mijeloperoksidazu dok sekundarne sudjeluju u procesima adhezije i dijapedeze samog monocita. Najvažniji stanični biljeg je CD14, receptor za lipopolisaharide. Vezivanjem CD14 i lipopolisaharida započinje proces aktivacije monocita i prijelaz u tkiva.

Monociti nakon sazrijevanja cirkuliraju u krvi 8-72 sata, a zatim prelaze u tkiva i sazrijevaju u tkivne makrofage. Uz uklanjanje mikroorganizama, oni otprilike fagocitiraju 2 x 10^{11} eritrocita dnevno, što ih, uz obrambenu ulogu, čini bitnim regulatorima homeostaze.

1.1.2. Limfociti

Limfociti su glavne stanice stečene imunosti. Odgovorni su za specifično prepoznavanje antigena. Svi limfociti nastaju iz matičnih stanica, ali je razvoj pojedine stanice specifičan ovisno o tipu limfocita. Limfociti T razvijaju se u timusu, a limfociti B u fetalnoj jetri i koštanoj srži. Limfociti su stanice veličine 7-15 μm. Bojanjem po Pappenheimu oskudna citoplazma se boji svijetlo plavo, a okrugla jezgra se boji intenzivno tamno plavo (slika 2.).



Slika 2: Mikroskopski prikaz limfocita u razmazu periferne krvi bojanom po Pappenheimu (http://labmed.hallym.ac.kr/hematol/Normal-PBcells.htm, pristupljeno 01.07.2016.)

Uloga limfocita B prvenstveno je stvaranje antitijela koji sudjeluju u odstranjivanju ekstracelularnih patogena. Limfociti T većinom sudjeluju u odgovoru organizma na intracelularne patogene, ali sudjeluju u diferencijaciji limfocita B i općenitom imunosnom odgovoru organizma. Limfociti B izražavaju specifične antigenske receptore (imunoglobuline) tijekom razvoja. Kada je taj proces završen, izlučuju topive imunoglobuline (Ig) u vanstanični prostor. Svaki limfocit B genetički je predodređen za izražaj točno određenog receptora. Ako se veže za specifični antigen, limfocit B će se diferencirati i umnožiti u plazma stanice, koje proizvode velike količine topivog imunoglobulina (Ig). Topivi Ig su veliki glikoproteini koji se vežu za specifični antigen koji je aktivirao limfocit B i pomažu u opsonizaciji antigena.

T limfociti se dijele u nekoliko skupina ovisno o njihovoj funkciji. U prvu skupinu spadaju pomagački ili Th1 limfociti (engl. T-helper 1), koji reagiraju s mononuklearnim

fagocitima i pomažu u borbi protiv intracelularnih patogena. Th2 limfociti reagiraju s limfocitima B i potpomažu reakcije diferencijacije i sinteze Ig. Treća skupina limfocita T citotoksičnom reakcijom uništava stanice domaćina koje su zaražene virusom ili nekim drugim patogenom (citotoksični limfociti T). Četvrta grupa limfocita T su regulatorni limfociti T koji kontroliraju reakciju i sudjeluju u kontroli reakcije na vlastito. U svim slučajevima limfociti T prepoznaju antigene na drugim stanicama koristeći T-stanične receptore (TCR, engl. T-cell receptor).

Limfociti T dijele se u skupine i s obzirom na vrstu TCR koje izražavaju. Oni koji imaju heterodimerni αβ TCR dijele se na pomagačke (CD4+) i citotoksične (CD8+) limfocite T. Njihovi učinci na imunosni odgovor su višestruki i uključuju direktnu signalizaciju stanica-stanica ili indirektnu signalizaciju putem citokina koje izlučuju. Th1 stvaraju interleukin-2 (IL-2) i interferon-γ (IFN-γ) i ključni su u borbi protiv intracelularnih patogena. Th2 stvaraju IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 (Andreis, 2010).

1.2. Imunosni sustav

1.2.1. Upala

Upala predstavlja odgovor organizma koji je izazvan oštećenjem tkiva. Cilj aktivacije je uklanjanje ili razrjeđenje oštećujućeg agensa. Upala također potiče obnavljanje oštećenog tkiva te je stoga za organizam zaštitni, ali potencijalno opasan proces. Upalni proces se dijeli na akutni i kronični, s obzirom na trajanje i tip infiltrirajućih upalnih stanica. Akutna upala je nespecifičan proces u koji su uključeni neutrofilni granulociti i makrofagi, pri čemu dolazi do vazodilatacije i povećane propusnosti membrana. Sistemski se očituje visokom tjelesnom temperaturom uz neutrofiliju i limfocitozu. Simptomi su *Rubor, Tumor, Calor, Dolor, Functio laesa*, tj. crvenilo, oteklina, toplina, bol i gubitak funkcije. Primjeri različitih akutnih upalnih bolesti uključuju alergijske reakcije, upalu pluća, peptički čir ili sepsu. Uz limfocitozu i neutrofiliju povećava se sinteza proteina akutne faze u jetri, što rezultira povećanom koncentracijom fibrinogena, C-reaktivnog proteina (CRP) i serumskog amiloida A. Povećane koncentracije upalnih proteina uzrokuju ubrzanje sedimentacije eritrocita (SE), koja je jedan od biljega akutne faze u upalnim, time i reumatoidnim bolestima (Roitt i sur, 2013).

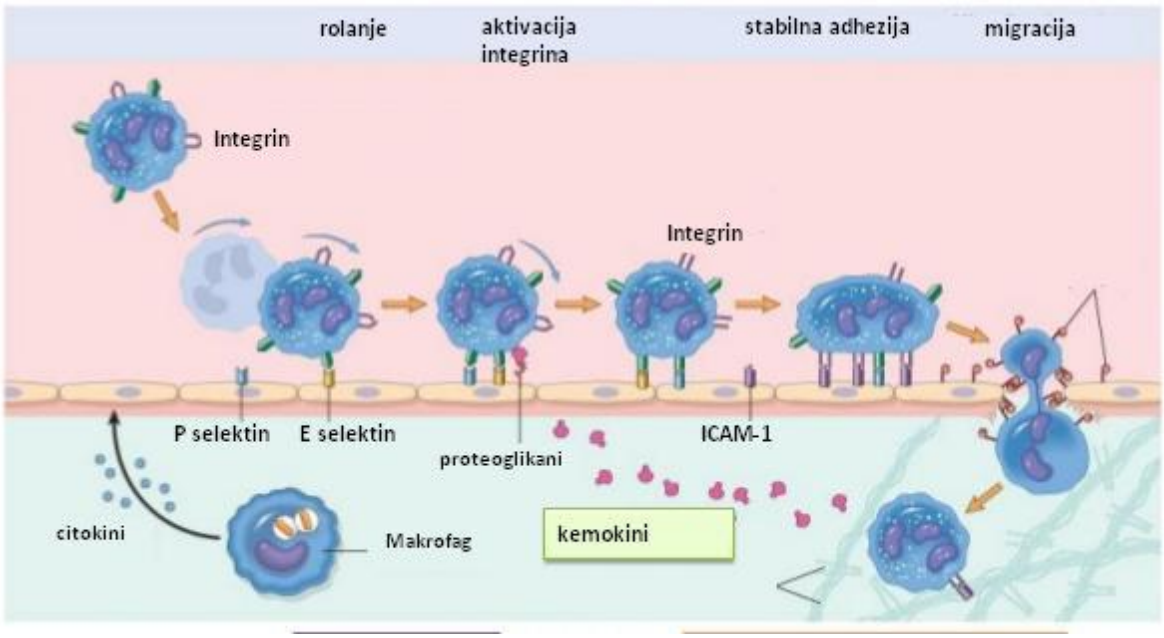
Kronična upala je specifična, dugotrajna (tjedni do mjeseci) sa stalno prisutnom nekrozom tkiva. Dolazi do fibroze, angiogeneze, a stanice uključene u ovaj proces su limfociti, makrofagi, plazma stanice te fibroblasti. U perifernoj krvi često nema promjena,

broj leukocita varira te dolazi do povećanja koncentracije Ig u plazmi. Karakterizira ju istovremena prisutnost akutne upale, razaranja i obnavljanja tkiva, infiltracije mononukleara i zacjeljivanja uz stvaranje ožiljka.

Vaskularni odgovor organizma na podražaj nekog upalnog faktora ključan je za njegovu obranu, a uključuje promjene promjera krvnih žila koje počinju kratkom vazokonstrikcijom te zatim vazodilatacijom što uzrokuje *Rubor* i *Calor* zbog nakupljanja krvi. Također, povećava se propusnost membrana za proteine plazme što izaziva *Tumor*, a gubitak tekućine dovodi do staze, točnije do ukoncentriravanja eritrocita i usporavanja krvnog protoka. Zbog staze i aktivacije leukocita dolazi do migracije leukocita u tkiva prema izvoru upale. Prve stanice koje dolaze na mjesto upale su neutrofilni granulociti (unutar 6-24 sata).

Ekstravazacija leukocita je proces koji uključuje 5 koraka: marginaciju, rolanje, adheziju, diapedezu i migraciju (slika 3.). Aktivacija endotela nužna je za inicijaciju procesa ekstravazacije leukocita. Kako bi stanica usporila, zaustavila se i prešla iz lumena krvne žile u endotel potrebno je da endotelne stanice izražavaju adhezijske molekule s kojima će reagirati komplementarne molekule na leukocitima. Ova aktivacija i izražaj adhezijskih molekula potaknuti su medijatorima upale poput IL, histamina ili TNF-α (engl. Tumor necrosis factor-α).

Adhezijske molekule uključuju ICAM-1 (engl. Intercellular adhesion molecule-1), ICAM-2 (engl. Intercellular adhesion molecule-2), VCAM-1 (engl. Vascular cell adhesion molecule) i MAdCAM (engl. Mucosal addressin cell adhesion molecule). One pripadaju imunoglobulinskoj porodici adhezijskih molekula te su ligandi integrina na leukocitima, poput LFA-1 (engl. Lymphocyte function associated antigen 1) ili MAC1 (engl. Macrophage 1 antigen). Uz ovu porodicu, u migraciju leukocita uključeni su i selektini (E-selektin na endotelu, P-selektin na endotelu i trombocitima te L selektin na leukocitima), proteoglikani (npr. heparan sulfat na endotelu) te već spomenuti integrini. Samo usporavanje leukocita u toku krvi, ključno za ovaj proces, osiguravaju selektini slabim vezama između lektina i šećera, što osigurava stvaranje i kidanje veza između selektina i liganda (Roitt i sur, 2013).



Slika 3: Prikaz ekstravazacije leukocita iz lumena krvne žile temeljem interakcije integrina i receptora (preuzeto s https://www.studyblue.com/notes/note/n/case-2/deck/6033043)

Po završetku imunosnog odgovora u krvi i u tkivu se nalaze brojni aktivirani limfociti te je aktiviran veliki broj upalnih stanica. Različiti mehanizmi za završetak odgovora nužni su kako bi se spriječilo oštećenje organizma ili razvitak kronične upale. Iako točan mehanizam još nije razjašnjen, zna se da neutrofilni granulociti sami po sebi imaju kratko poluvrijeme života i da protuupalni citokini poput TGF-β (engl. Tumor growth factor-β) mogu inhibirati sintezu proupalnih citokina.

Uz sve poznate biljege upalnog stanja poput CRP-a ili vrijednosti SE, u zadnjih nekoliko godina počela su istraživanja morfologije upalnih stanica. Prva istraživanja uključivala su analizu svih populacija leukocita tijekom akutne ili kronične upale. Rezultati pokazuju odličnu korelaciju veličine stanica svih populacija s fazom upalnog stanja, npr. neutrofilnih granulocita u infekciji virusima ili limfocita kod akutnih upalnih stanja. Zbog patofiziologije procesa, daljnja istraživanja povezala su morfološke promjene neutrofilnih granulocita s akutnom upalom, a limfocita i monocita s kroničnom upalom. Ovi rezultati u skladu su s poznatim podatcima o uključenosti pojedinih populacija stanica u različitim stanjima poput infekcije virusima, sepse ili kronične upale (Mardi i sur, 2009).

1.2.2. Autoimunost

Autoimunost predstavlja reakciju imunosnog sustava na sastavne dijelove vlastitog organizma. U autoimunim bolestima prisutno je značajno oštećenje tkiva, a ovisne su i o genetičkim i o vanjskim faktorima poput mikroorganizama. Organizam razvija toleranciju na vlastito, a narušavanje ovih procesa dovodi do autoimunih reakcija. Autoreaktivne T limfocite može izazvati nesposobnost naivnih Th stanica da se aktiviraju autoantigenima predstavljenim u MHC molekulama na površini vlastitih stanica. Uz to poliklonalna aktivacija ili narušena ravnoteža između regulacijskih i „helper“ stanica također mogu uzrokovati nastanak autoantitijela. U slučaju upalnih reumatskih autoimunih bolesti imunosni sustav se aktivira stvaranjem autoantitijela na jedan ili više autoantigena. Gubitak kontrole nad prepoznavanjem „vlastitoga“ posljedica je dugoročnog poremećaja regulacije funkcije mikrovaskularnog sustava. U organizmu normalno postoje autoreaktivni limfociti. U fiziološkim okolnostima reakcije su u homeostazi i potreban je vanjski podražaj autoantigena kako bi se aktivirala autoimuna reakcija. Gubitkom tolerancije limfocita T počinje autoimuna reakcija. U cijelom procesu limfociti T imaju pomagačku ulogu jer potiču diferencijaciju limfocita B. Nakon unosa vanjskih antigena koji služe kao imunogenični nosač počinje reakcija između autoantigena i autoreaktivnih limfocita. Idući mehanizam inicijacije autoimunog procesa je križna reakcija. Može se dogoditi da mikroorganizmi eksprimiraju neke epitope istovrsne epitopima domaćina analogno s drugim, drugačijim epitopima. Različiti epitopi na mikroorganizmu tada služe kao nosač i podražuju limfocite T, a oni istovrsni djeluju kao hapteni. Zbog križne reakcije organizam tijekom infekcije stvara antitijela i na strani antigen i na vlastiti hapten. To je mehanizam nastanka reumatske vrućice (molekularna mimikrija), a nastali reumatoidni faktor (RF) je zapravo protutijelo na vlastiti IgG. Laboratorijski se dokazuje testovima pasivne aglutinacije (Dodig, 2015; Andreis, 2010).

1.3. Reumatoidni artritis

1.3.1. Etiologija i patogeneza

Poremećaji u funkciji imunosnog sustava dovode do različitih poremećaja koji klinički variraju od alergija, deficijencija do autoimunih bolesti. Autoimune bolesti dijele se na sistemske i organski specifične. Sistemske bolesti zahvaćaju više organskih sustava te se kod njih dokazuje velik broj autoantitijela koji se sintetiziraju. Primjer takvih autoantitijela su antitijela na cikličke citrulinirane proteine (anti-CCP) kod reumatoidnog artritisa, antiribosomalna P autoantitijela u sistemskom eritemskom lupusu (SLE) ili antitopoizomeraza 1 u sklerodermiji. Popis nekih sistemskih autoimunih bolesti prikazan je u tablici 1.

Tablica 1: Sistemske autoimune bolesti i zahvaćeni organski sustavi

Bolest	**Organski sustav**
Sistemski eritemski lupus	Koža, središnji živčani sustav, krvožilni sustav
Sarkoidoza	Pluća, vezivno tkivo, limfni čvorovi
Multipla skleroza	Aksoni živčanih stanica
Reumatoidni artritis	Zglobovi, koža, pluća, srce

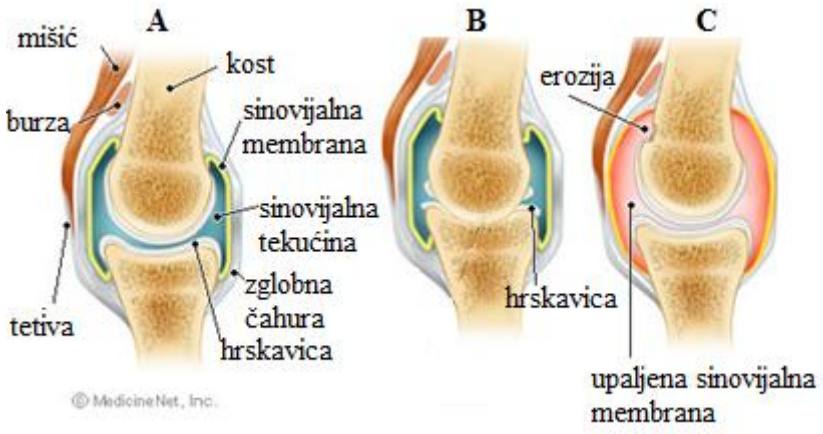
U slučaju organski specifičnih autoimunih bolesti sintetiziraju se autoantitijela koja su organski specifična, npr. antitijela na tireoidnu peroksidazu (anti-TPO) kod Hashimotovog tireoiditisa. Popis nekih organski specifičnih bolesti prikazan je u tablici 2.

Tablica 2: Organski specifične autoimune bolesti

Bolest	**Organski sustav**
Hashimotov tireoiditis	Štitnjača
Ulcerozni kolitis	Debelo crijevo
Dijabetes tip 1	Gušterača
Sindrom Sjögren	Žlijezde slinovnice

Reumatoidni artritis pripada skupini sistemskih autoimunih bolesti. Kao i ostale reumatske bolesti karakteriziraju ga dva simptoma: bol i ograničenje funkcije. Uz reumatoidni artritis postoji preko 120 različitih reumatskih bolesti koje dijelimo u skupine ovisno o patogenezi i simptomima (Čikeš i Ćurković, 2008).

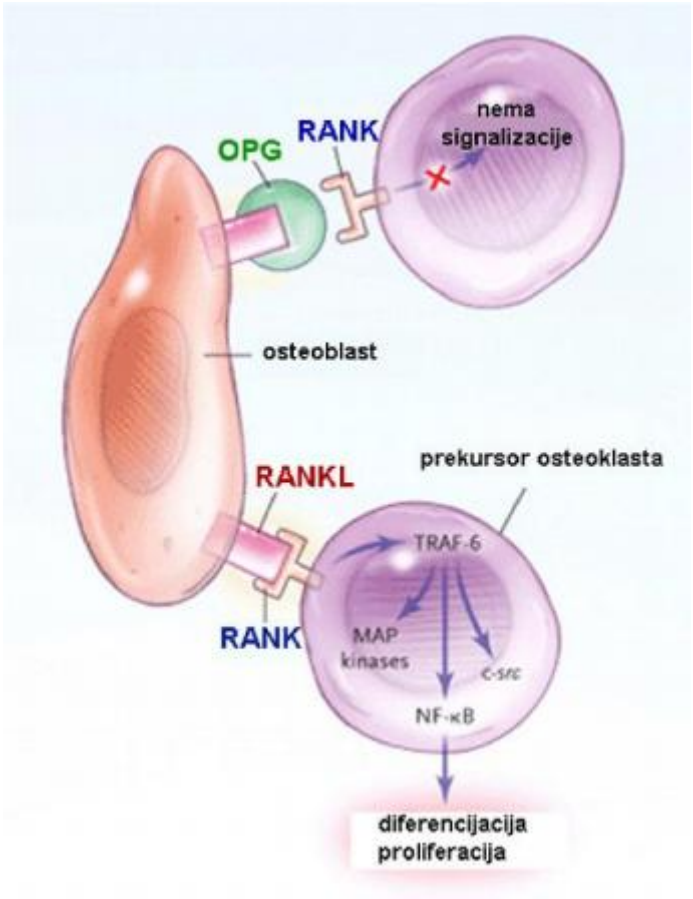
Reumatoidni artritis prvenstveno se očituje na zglobovima, ali se može očitovati i na drugim organskim sustavima. Od RA boluje oko 1% populacije, a bolest je dva puta češća u žena nego u muškaraca. Etiologija bolesti je nepoznata, iako su opisani čimbenici od onih vanjskih kao što je utjecaj dima cigareta do poremećaja mikrobioma ili djelovanja određenog mikroorganizma. Patogeneza reumatoidnog artritisa je vrlo složena. Zabilježeni su poremećaji na razini stanica, poglavito makrofaga, limfocita T i B te dendritičkih stanica. Sinovitis i bujanje granulacijskog tkiva koje prekriva zglobne površine i razara ih patološke su karakteristike RA. Procesi počinju aktivacijom endotela, bilo pod utjecajem nekog vanjskog čimbenika ili mikroorganizma. Aktivirani endotel luči niz proupalnih molekula, ali uz to on postaje i propusniji. To omogućava ekstravazaciju leukocita, uz pojačano lučenje citokina. Zbog povećane sinteze upalnih proteina unutar samog zgloba narušava se ravnoteža membranskog transporta, raste osmotski tlak što dovodi do vidljivog simptoma ove bolesti, a to je pojava izljeva tj. oteknuća zgloba. Kronična upala zglobne ovojnice uzrokovana je aktivacijom CD4+ limfocita T (Čikeš i Ćurković, 2008).



Slika 4: Anatomski prikaz promjena u zglobu: A – zdravi zglob, B – osteoartritis, C – reumatoidni artritis (preuzeto s http://www.medicinenet.com/rheumatoid_arthritis/article.htm)

Unutar sinovijalne membrane razvijaju se limfoidni folikuli, mjesto interakcije limfocita T i B. Aktivacijom limfocita B počinje sinteza citokina i autoantitijela, uključujući anti-CCP.

Aktiviraju se sinovijalni makrofagi koji aktiviraju fibroblaste, što dovodi do oštećenja hrskavice i edema. Aktivirani fibroblasti bogat su izvor metaloproteinaza koje uzrokuju oštećenje i remodeliranje. Limfociti T izlučuju RANKL (engl. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), što potiče aktivaciju RANK (engl. Receptor activator of nuclear factor kappa-B) i inicijaciju procesa resorpcije kosti.



Slika 5: Aktivacija osteoklasta temeljem interakcije RANKL i RANK na osteoblastima (preuzeto iz Katzung i sur, 2011.)

Najnovija istraživanja bave se ulogom angiogeneze u patologiji ovoga procesa. Zbog jake metaboličke aktivnosti leukocita i endotelnih stanica dolazi do angiogeneze, koja je uz VEGF (engl. Vascular endothelial growth factor) tema današnjih istraživanja lijekova (Paleolog, 2009).

1.3.2. Dijagnostika

U postavljanju dijagnoze koristi se više metoda koje uključuju ultrazvuk, magnetsku rezonanciju, imunoscintigrafiju i laboratorijske pretrage poput anti-CCP, CRP, kompletne krvne slike (KKS), brzine SE i RF.

Reumatoidni faktor je antitijelo na Fc dio IgG. Sintetizira se normalno u organizmu, ali u slučaju reumatoidnog artritisa proizvodnja je stalna i lokalizirana. Antitijela mogu biti klase IgG, IgM ili IgA. Oko 70% pacijenata imaju pozitivan RF u serumu. RF nije dijagnostički specifičan za RA. Ukoliko su vrijednosti unutar referentnog intervala, to ne isključuje dijagnozu RA (seronegativni RA). Kod seropozitivnog reumatoidnog artritisa RF služi kao prognostički faktor. RF može biti povišen i u drugim bolestima, npr. kroničnim infekcijama, zloćudnim bolestima i kolagenozama. Koncentracija RF se određuje nefelometrijski ili pasivnom aglutinacijom. Anti-CCP prediktor je razvoja erozija. Visoko je specifičan (90%) i osjetljiv (96%) za dijagnostiku RA (Wegner i sur., 2010; Tešija Kuna i Žirović, 2008). U laboratoriju se uz specifične biljege rutinski analizira i KKS, gdje se može primijetiti blago hipokromna normocitna anemija. U malom broju slučajeva može se primijetiti i neutropenija (uz splenomegaliju). Aktivnost bolesti prati se reaktantima akutne faze poput CRP-a ili brzine SE. Što se tiče elferograma, česta je poliklonska hipergamaglobulinemija, a koncentracije komponenta komplementa su ili unutar referentnog intervala ili su povišene. Uz pretrage venske krvi važna je i pretraga sinovijalne tekućine. U aktivnom RA sinovijalna tekućina je zamućena, žuta, s 10.000-50.000 leukocita/μL od kojih su većina limfociti.

Prema American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative klasifikacijskim kriterijima za dijagnozu RA iz 2010. godine postavljeni su opisni kriteriji dijagnostike RA koji su podijeljeni u 4 kategorije: uključenost zglobova, serološke pretrage, reaktanti akutne faze te trajanje simptoma. Svakom stanju pridružen je određen broj bodova. Zbroj bodova u svim kategorijama daje informaciju radi li se o reumatoidnom artritisu (≥6) ili nekom drugom stanju. Popis kriterija prikazan je u tablici 3. Daljnjim pretragama bi se trebali podvrgnuti bolesnici koji imaju barem jedan zglob s definitivnim kliničkim sinovitisom koji nije bolje objašnjen nekom drugom patologijom.

Uključeni zglobovi odnose se na bilo koji bolan ili otečen zglob. Distalni interfalangealni, prvi karpometakarpalni i prvi metatarzofalangealni zglobovi su isključeni iz kriterija. Veliki zglobovi uključuju rameni zglob, lakat, kukove, koljena i gležnjeve. Mali

zglobovi su metakarpofalangealni, proksimalni interfalangealni i zglobovi šake (Aletaha i sur, 2010).

Tablica 3: Kriteriji za postavljanje dijagnoze reumatoidnog artritisa ovisno o zahvaćenosti zglobova, serološkim pretragama, reaktantima akutne faze i trajanju simptoma

KATEGORIJA	BROJ BODOVA
A) ZGLOBOVI	
1. 1 veliki zglob	0
2. 2-10 velikih zglobova	1
3. 1-3 malih zglobova*	2
4. 4-10 malih zglobova*	3
5. >10 zglobova (min. 1 mali zglob)	5
B) SEROLOŠKE PRETRAGE	
1. RF + anti-CCP unutar referentnog intervala	0
2. „low positive“ RF† ili anti-CCP‡	2
3. „high positive“ RF† ili anti-CCP‡	3
C) REAKTANTI AKUTNE FAZE	
1. CRP i SE unutar referentnog intervala	0
2. Povišeni CRP ili SE	1
D) TRAJANJE SIMPTOMA	
1. < 6 tjedana	0
2. > 6 tjedana	1

** bez obzira na zahvaćene velike zglobove;† engl. Low positive rheumatoid factor, High positive rheumatoid factor; ‡ engl. low positive anti-cyclic citrullinated peptide, High positive anti-cyclic citrullinated peptide*

Uz sve dijagnostičke metode konačnu odluku o dijagnozi donosi liječnik reumatolog na osnovi kliničke slike i nalaza.

Uz opće simptome koji uključuju povišenu tjelesnu temperaturu, umor, malaksalost, gubitak teka i opću klonulost, ovu bolest karakteriziraju drugi zglobni simptomi poput zakočenja zgloba koje je karakteristično simetrično. Tipično traje više od sat vremena nakon

buđenja, ali se javlja i pri duljoj neaktivnosti. Oštećeni zglob postaje osjetljiv, otečen i ograničene pokretljivosti. Zbog istezanja čahure zglobovi se drže u semifleksiji kako bi se smanjila bol. Zbog svega se razvijaju deformiteti, a tipični su ulnarna devijacija, oblik labuđeg vrata ili Buotonniere deformitet (slika 6).



Slika 6: Prikaz deformacija prstiju pacijenta s reumatoidnim artritisom (preuzeto s http://www.perpetuum-lab.com.hr)

U kliničkoj praksi kod dijagnosticiranja kroničnih bolesti teško je definirati granice rane dijagnoze. U slučaju RA, vrlo rana dijagnoza je ona koja se uspostavi unutar 12 tjedana od pojave prvih simptoma, a kasna rana dijagnoza ona koja se uspostavi u rasponu od šest mjeseci do tri godine trajanja bolesti. Period od 12 tjedana od početka simptoma pokazao se prihvatljivim u praksi s obzirom na terapiju DMARD (engl. Disease Modifying Antirheumatic Drug), jer se primijetilo da bolesnici kojima se daju DMARD unutar tri mjeseca od početka bolesti imaju bolji konačni ishod, tj. veću vjerojatnost postizanja remisije bolesti (Ćurković, 2007).

1.3.3. Praćenje aktivnosti bolesti

Kriteriji Američkog reumatološkog društva i Europske lige za borbu protiv reumatizma (EULAR) najčešće se primjenjuju za procjenu aktivnosti bolesti i učinkovitosti terapije. EULAR-ovi kriteriji uključuju DAS (engl. Disease Activity Score), koji se računa na temelju broja bolnih i otečenih zglobova, vrijednosti brzine SE ili koncentracije CRP-a u serumu i bolesnikove procjene stanja (VAS). Postoje mnoge modifikacije DAS-a, ali se u kliničkoj praksi koristi DAS28, koji uključuje 28 zglobova. Ukupni DAS28<3,2 znači da je bolest slabo aktivna, a DAS28>5,1 da je bolest jako aktivna (Aletaha i sur, 2010).

Cilj terapije je postizanje remisije, koja se preko DAS28 definira kao svaka vrijednost manja od 2,6. Prema Američkom reumatološkom društvu remisija je postignuta kada je na dva uzastopna mjesečna pregleda jutarnja zakočenost trajala manje od 15 minuta, bez boli u zglobovima, umora, boli pri pokretu ili palpaciji, bez otečenih zglobova te s urednim nalazom brzine SE (Aletaha i sur, 2010).

1.3.4. Farmakološko liječenje

1.3.4.1. DMARD

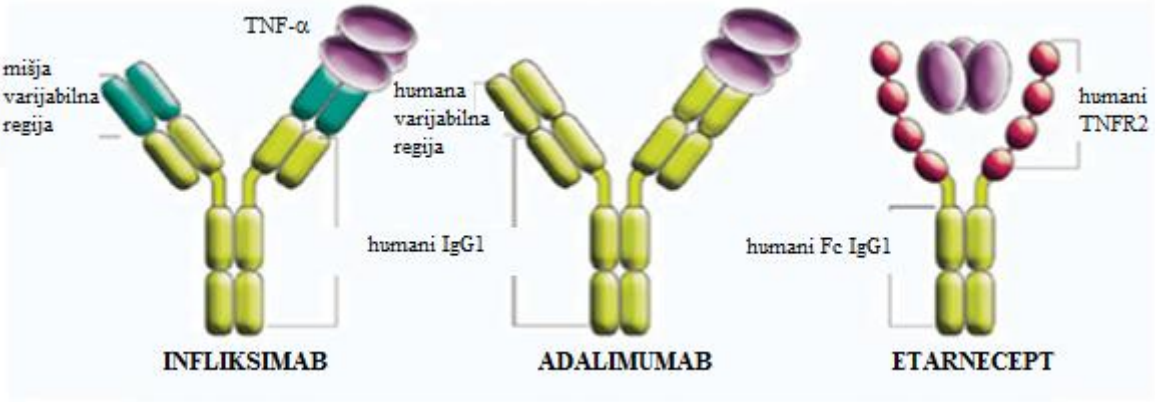
Kod novootkrivene bolesti prva linija liječenja uključuje DMARD (metotreksat + najmanje jedan od ostalih DMARD) idealno unutar mjesec dana od pojave simptoma. U slučaju da je ovakva terapija učinkovita, oprezno treba pokušati sa smanjivanjem doze. Kod bolesnika gdje ovakva terapija nije prikladna, treba započeti DMARD monoterapiju s naglaskom na brzo utvrđivanje klinički učinkovite doze (bez obzira na izbor DMARD).

Kako bi se brzo iskontrolirao upalni proces u terapiju se uvode i glukokortikoidi. U većini slučajeva oni se koriste kratkotrajno, kako bi se spriječilo pogoršanje stanja bolesnika. Dugotrajna terapija glukokortikoidima uvodi se iznimno u situacijama kada su ponuđene sve druge terapijske mogućnosti te kada su s bolesnikom komplikacije u potpunosti razmotrene.

1.3.4.2. Biološka terapija

Biološki lijekovi su skupina lijekova razvijeni kao rekombinantni proteini na pojedine upalne komponente, zahvaljujući boljem razumijevanju patogeneze reumatoidnog artritisa. Skupina bioloških lijekova obuhvaća monoklonska antitijela, rekombinantne citokine i inhibitore citokina te fuzijske proteine topivih receptora. Zbog dobre učinkovitosti i sigurnog profila primjena bioloških lijekova je velika, ali intravenska ili subkutana primjena te visoka cijena razlozi su zašto biološka terapija nije prva linija liječenja ovakvih bolesti. Prvi biološki lijek koji je odobren za liječenje reumatoidnog artritisa je Etarnecept, inhibitor TNF-α, 1998. godine. Inhibitori TNF-α su učinkoviti u terapiji RA, ali ipak određeni postotak bolesnika ne odgovara na takvu terapiju ili nema optimalan odgovor. Usporedba struktura različitih inhibitora TNF-α prikazana je na slici 7. Zbog neadekvatnog odgovora bolesnika na terapiju

inhibitorima TNF-α razvijeni su biološki lijekovi sa ciljevima koji uključuju drugi put procesa aktivacije upale, npr. IL-6, IL-1 ili limfocite B.



Slika 7: Usporedba strukture različitih inhibitora TNF-α: infliksimab, adalimumab, etarnecept (preuzeto s www.jrheum.org)

U tablici 4. prikazani su primjeri bioloških lijekova uz opisanu primjenu, izvor antitijela te primijenjenu dozu.

Tablica 4: Popis nekih odobrenih bioloških lijekova ovisno o tipu antitijela i djelovanju u Republici Hrvatskoj

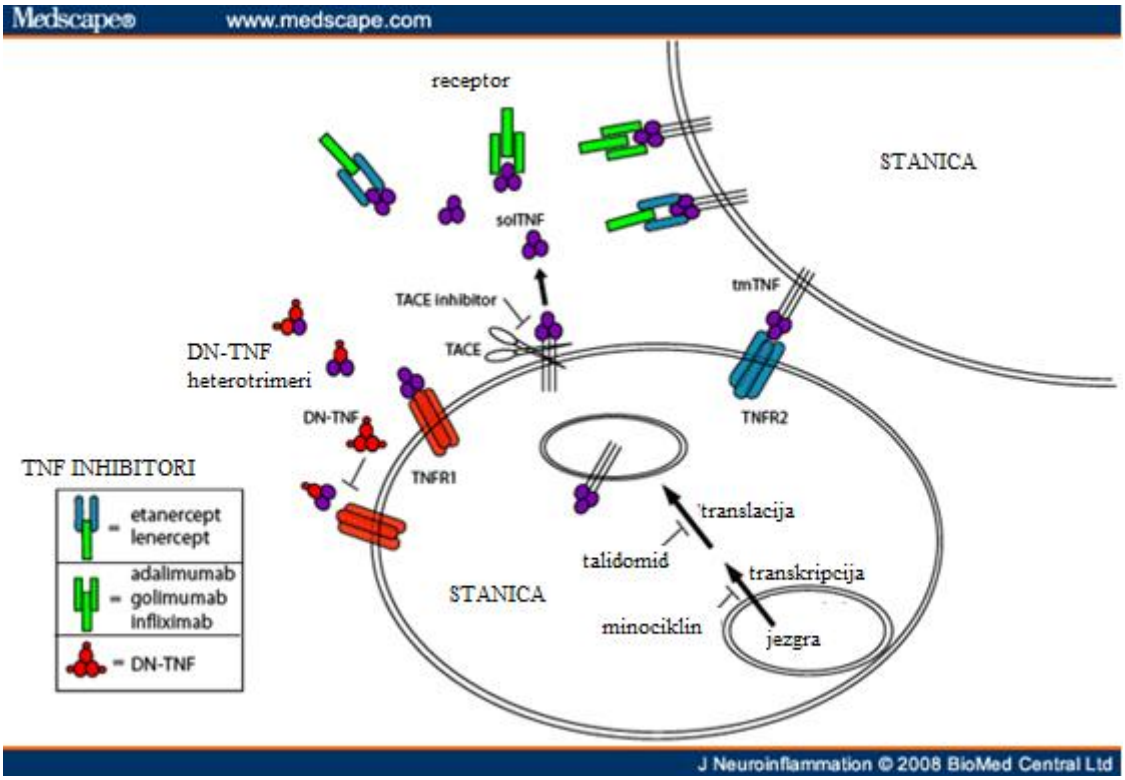
LIJEK	TIP TERAPIJE	CILJ	PRIMJENA	DOZA
Infliksimab	Mišje antitijelo	TNF-α	i.v.*	3 mg/kg 4-8 tjedana
Etarnecept	Receptor fuzijskog proteina	TNF-α	s.c.*	50mg tjedno
Tocilizumab	Humano antitijelo	IL-6 receptor	i.v.*	4-8 mg/kg Svaka 4 tjedna
Rituksimab	Kimerično antitijelo	CD20+ limfociti B	i.v.*	2 x 1000mg unutar 2 tjedna Zatim svakih 6 mjeseci

*i.v. – intravenski; s.c. – subkutano

Inhibitori TNF-α

Infliksimab je kimerno ljudsko-mišje monoklonsko protutijelo IgG1 proizvedeno na mišjim hibridoma stanicama tehnologijom rekombinantne DNA.

TNF-α je proupalni citokin poznat kao medijator kroničnih upalnih bolesti. To je transmembranski prekursor koji prelazi u topivi trimer. Vezanje membranskog i topivog oblika TNF-α uzrokuje sintezu drugih proupalnih citokina i adhezijskih molekula. Mehanizam djelovanja inhibitora prikazan je na slici 8.



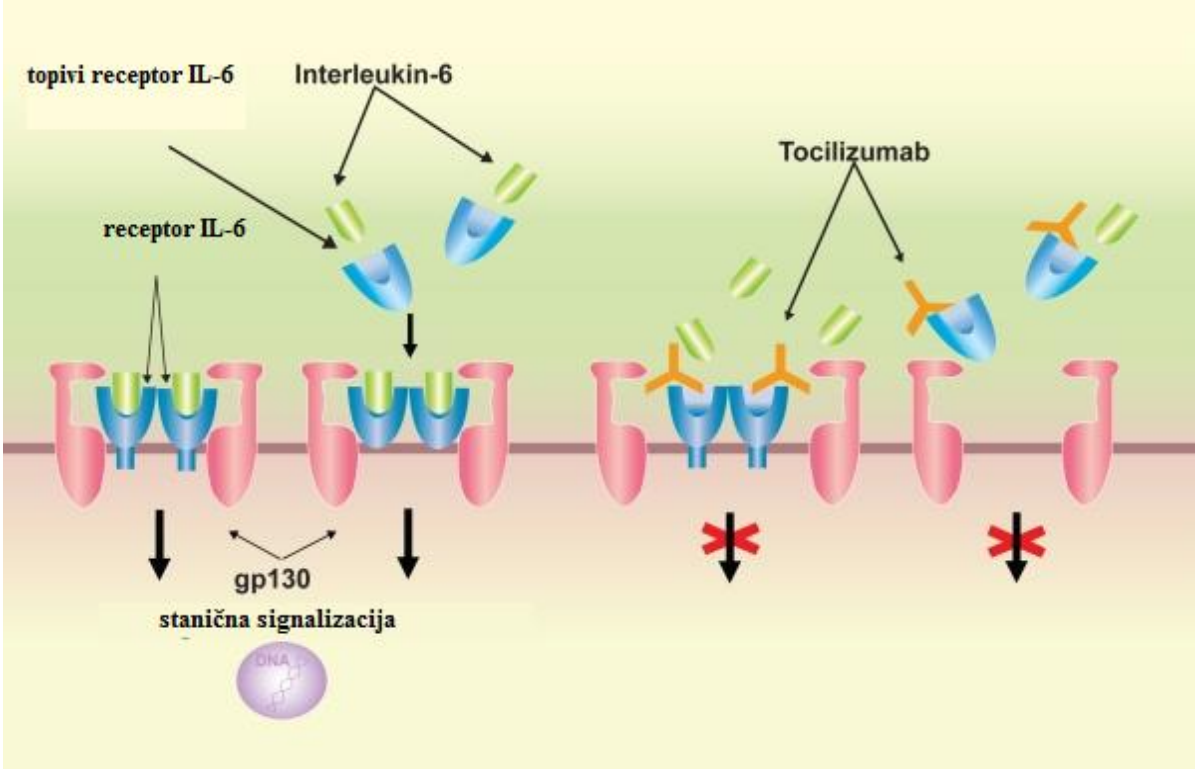
Slika 8: Mehanizam djelovanja bioloških lijekova usmjerenih na TNF-α (preuzeto s http://www.medscape.com)

Uloga TNF-α u RA dokazana je u nekoliko primjera. U sinovijalnoj tekućini bolesnika pronađena je povišena koncentracija TNF-α u odnosu na kontrolnu skupinu, a drugi dokazi proizlaze iz životinjskih modela gdje je pokazano da TNF-α ubrzava aktivnost bolesti te da antitijela na TNF-α smanjuju aktivnost bolesti. Primjenjuju se intravenski ili subkutano u kombinaciji s metotreksatom.

Razlike između pojedinih inhibitora TNF-α očituju se u afinitetu vezanja TNF-α, imunogenosti, farmakokinetici te specifičnosti. Infliksimab je visoko specifičan za TNF-α za razliku od etarnecepta koji jednako veže i TNF-α i limfotoksin (Katzung i sur, 2011).

Inhibitori IL-6

IL-6 ima ulogu u regulaciji imunološkog odgovora. U zglobovima bolesnika sintetiziraju ga u velikim količinama makrofagi te sinovijalne stanice, uzrokuje poliklonsku hipergamaglobulinemiju i pojačanu ekspresiju ICAM-1 čime potiče ulazak upalnih stanica u sinoviju. Potiče angiogenezu zbog pojačane sinteze VEGF-a te povećava sintezu metaloproteinaza i aktivaciju osteoklasta uključenih u proces resorpcije kosti. Povećava i koncentracije općenitih upalnih parametara poput CRP-a i serumskog amiloida A.
Prijenos signala uključuje vezanje za receptor koji se spaja s gp130 pri čemu nastaje dimer (slika 9). Receptor za IL-6 postoji i u topivom obliku te također ima mogućnost vezanja za gp130.



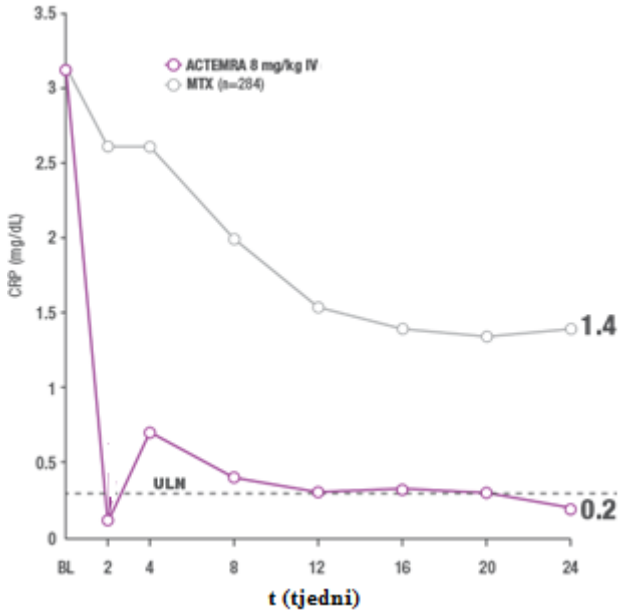
Slika 9: Mehanizam djelovanja IL-6 inhibitora (preuzeto s www.sprout038.sprout.yale.edu)

Indikacija za upotrebu je liječenje teškog oblika aktivnog i progresivnog RA u odraslih bolesnika koji prethodno nisu liječeni metotreksatom. Također se primjenjuju kao terapija

umjerenog do teškog oblika aktivnog RA u odraslih bolesnika koji nisu pokazali primjeren odgovor ili nisu podnosili prethodnu terapiju s jednim ili više DMARD ili anti-TNF-α.

RoActemra (tocilizumab) je humanizirano monoklonsko protutijelo IgG1 na receptor humanog IL-6 proizvedeno u stanicama jajnika kineskog hrčka pomoću tehnologije rekombinantne DNA. Farmakološki oblik je otopina, bistra do opalescentna, bezbojna do blijedožuta.

Dostupni podaci ukazuju da se kliničko poboljšanje postiže u roku od 6 tjedana od početka primjene lijeka RoActemra (slika 10). Temeljem radioloških snimaka zglobova pokazano je da RoActemra u kombinaciji s metotreksatom usporava progresiju oštećenja zglobova i poboljšava fizičku funkciju. U bolesnika u kojih nema znakova poboljšanja unutar tog razdoblja, daljnji nastavak terapije treba pozorno razmotriti. Zabilježeni su slučajevi smanjenja broja neutrofilnih granulocita i trombocita nakon primjene tocilizumaba u dozi od 8 mg/kg u kombinaciji s metotreksatom. Može postojati povećan rizik od neutropenije u bolesnika koji su prije bili liječeni antagonistima TNF-α.



Slika 10: Grafički prikaz koncentracije CRP-a u serumu bolesnika u ovisnosi o primjenjenoj dozi inhibitora IL-6 i metotreksata te vremenu učinka (preuzeto s http://www.actemra.com)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

S obzirom na učestalost reumatoidnog artritisa, složenu patologiju i nove mete lijekova za ublažavanje simptoma ove bolesti, cilj ovog rada bio je proučiti prosječne volumene populacija leukocita i njihovu potencijalnu vrijednost kao biljega aktivnosti ove bolesti.

U tu svrhu korišten je Beckman Coulter DxH800 automatski analizator na kojemu su se analizirali uzorci venske krvi bolesnika iz dnevne bolnice Zavoda za kliničku imunologiju i reumatologiju, Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i prikupljali potrebni podatci. Specifični ciljevi ovog rada bili su usporediti vrijednosti prosječnog volumena limfocita (MCV Ly) i prosječnog volumena monocita (MCV Mo) u skupinama (reumatoidni artritis i kontrolna skupina) i podskupinama bolesnika (aktivna bolest i remisija), korelirati vrijednosti ovih parametara s koncentracijom CRP-a i DAS28, procijeniti dijagnostičku točnost ovih parametara i povezati ih sa vrstom terapije koju bolesnici primaju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb u razdoblju od 1.1.2016. do 1.5.2016. Istraživanje je uključivalo ukupno 140 uzoraka krvi bolesnika iz dnevne bolnice Zavoda za kliničku imunologiju i reumatologiju, Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb s dijagnosticiranim reumatoidnim artritisom (RA) te 32 uzorka krvi ispitanika primljenih na sistematske preglede u Klinički bolnički centar Zagreb (kontrolna skupina). Bolesnicima je postavljena dijagnoza seropozitivnog reumatoidnog artritisa (M05) ili ostalih reumatoidnih artritisa (M06). Skupina bolesnika je podijeljena u dvije podskupine: aktivna bolest i remisija. Podjela je učinjena na temelju nalaza brzine SE i CRP-a. Uvjet za aktivnu bolest bile su povišene vrijednosti oba parametra, dok je uvjet za remisiju bolesti bio nalaz ovih parametara unutar referentnog intervala. Ukupan broj uzoraka u podskupini aktivni reumatoidni artritis bio je 36, a uzoraka u podskupini remisija 104.

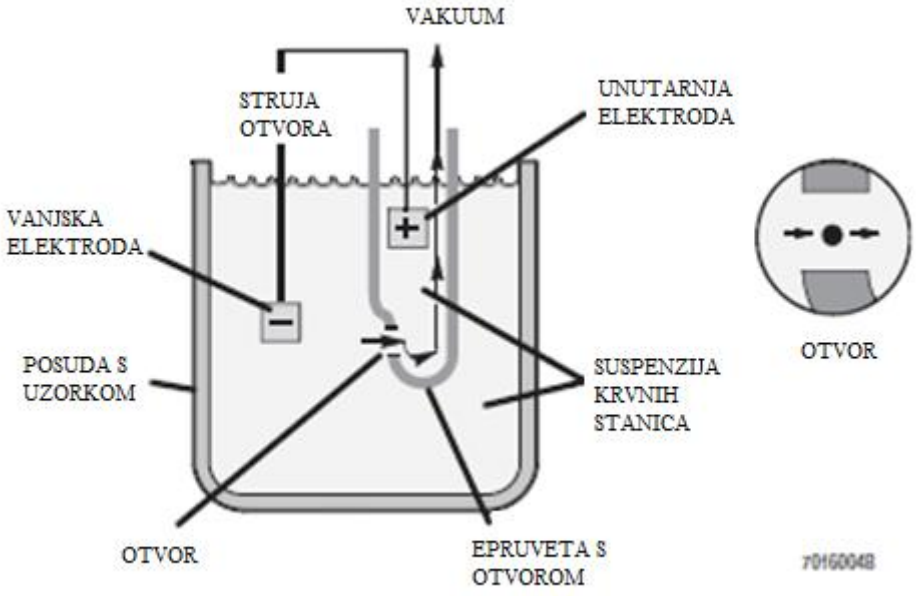
U uzorcima bolesnika provedeno je određivanje KKS, brzine SE i CRP, a u kontrolnoj skupini određena je KKS. U skupini bolesnika dodatno je izračunat parametar DAS na temelju brzine SE.

Kao uzorak korištena je venska krv uzorkovana prema standardnoj proceduri u epruvetu s podtlakom i odgovarajućim antikoagulantom. Sustav epruveta s podtlakom osigurava punjenje epruveta unutar 10% zadanog volumena. Mjesto uboda prethodno se dezinficira 70%-tnim etanolom i osuši. Na nadlaktici se primjeni tlak visine dijastoličkog tlaka, a nakon ulaska igle u venu podveza se popusti kako bi se izbjegla hemokoncentracija (Labar i Hauptman, 2007). Za pretragu KKS korištene su epruvete s EDTA kao antikoagulantom, za određivanje brzine SE epruvete s Na-citratom (omjer krvi i antikoagulanta = 1:5), a za određivanje koncentracije CRP-a epruvete s heparinom. Uzorak za određivanje KKS i SE je puna krv, a za pretragu CRP korištena je plazma dobivena centrifugiranjem uzorka na 2000g tijekom 10 minuta.

3.2. Metode

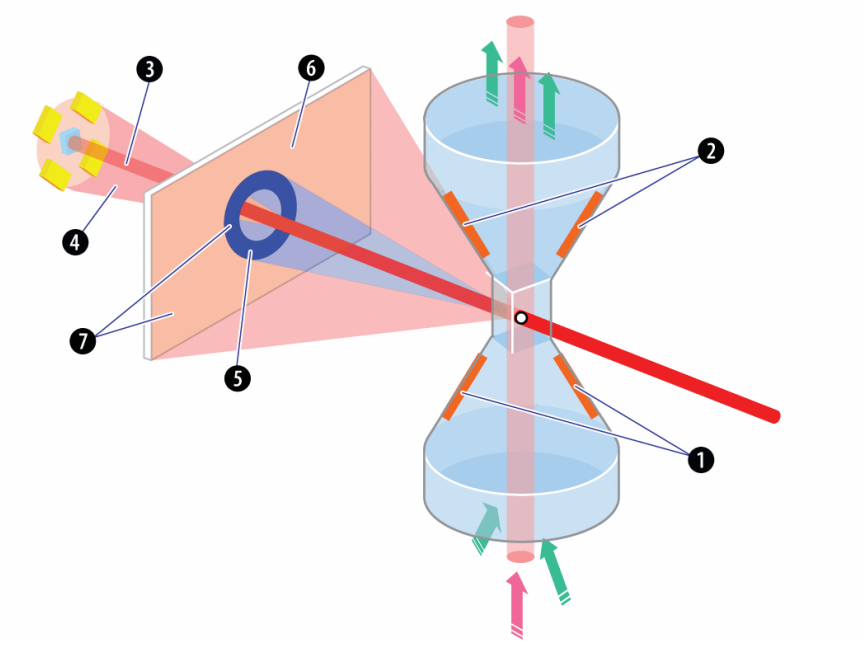
3.2.1. Kompletna krvna slika

Analiza KKS učinjena je na automatskom hematološkom analizatoru Beckman Coulter DxH800. Dva su osnovna načela brojenja stanica u hematološkim brojačima: promjena otpora i rasap svjetlosti. Tzv. *Coulter metoda* je metoda promjene otpora koju je uveo Wallace Coulter. Ova metoda zasniva se na promjeni električnog otpora pri prolasku čestice kroz uski otvor između dvije elektrode. Za pouzdanu detekciju svake pojedinačne stanice važno je da stanice prolaze pojedinačno kroz uski otvor, što se osigurava hidrodinamičkim fokusiranjem. Uzorak se nakon aspiracije ubrizgava u tok obložne tekućine (engl. „sheat fluid“). Tlak uzorka i tlak obložne tekućine su različiti, točnije tlak uzorka je veći od tlaka obložne tekućine. Svaka stanica reagira kao izolator i pri prolasku kroz uski otvor promjena otpora je mjerljiva u vidu napona, a omogućuje brojanje stanica, jer je broj promjena razmjeran broju stanica. Također, intenzitet promjene je razmjeran veličini stanice, što omogućuje razvrstavanje stanica po veličini i određivanje srednjeg volumena stanica. Dobiveni podatci se prikazuju grafički u obliku histograma.



Slika 11: Shematski prikaz metode promjene otpora (preuzeto iz UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System Instructions for Use, 2009)

Za određivanje diferencijalne krvne slike (DKS) analizator koristi tehnologiju VCS koja uključuje mjerenje rasapa svjetlosti (engl. Scatter), vodljivosti (engl. Conductivity) primjenom radio-frekvencije i promjene otpora primjenom istosmjerne struje. Dobiveni podatci rasapa svjetlosti mjera su složenosti unutarnje i površinske strukture stanice. Vodljivost je mjera unutarnje gustoće stanice, a promjena otpora mjera je veličine stanice (engl. Volume). Kako hidrodinamička struja uzorka prolazi kroz područje detekcije ona prekida zraku monokromatske laserske svjetlosti koja se rasipa u svim smjerovima. Ukupan raspad je rezultat nekoliko fizikalnih procesa, ogiba, apsorpcije, refrakcije i refleksije. Raspršeno svjetlo skuplja se lećama i detektira se pomoću fotodioda, koje pretvaraju fotone svjetla u elektronske signale. Fotomultiplikatori pojačavaju one slabije signale. Slika 12. prikazuje sve smjerove rasapa koji se detektiraju, a opisani su u tablici 7.



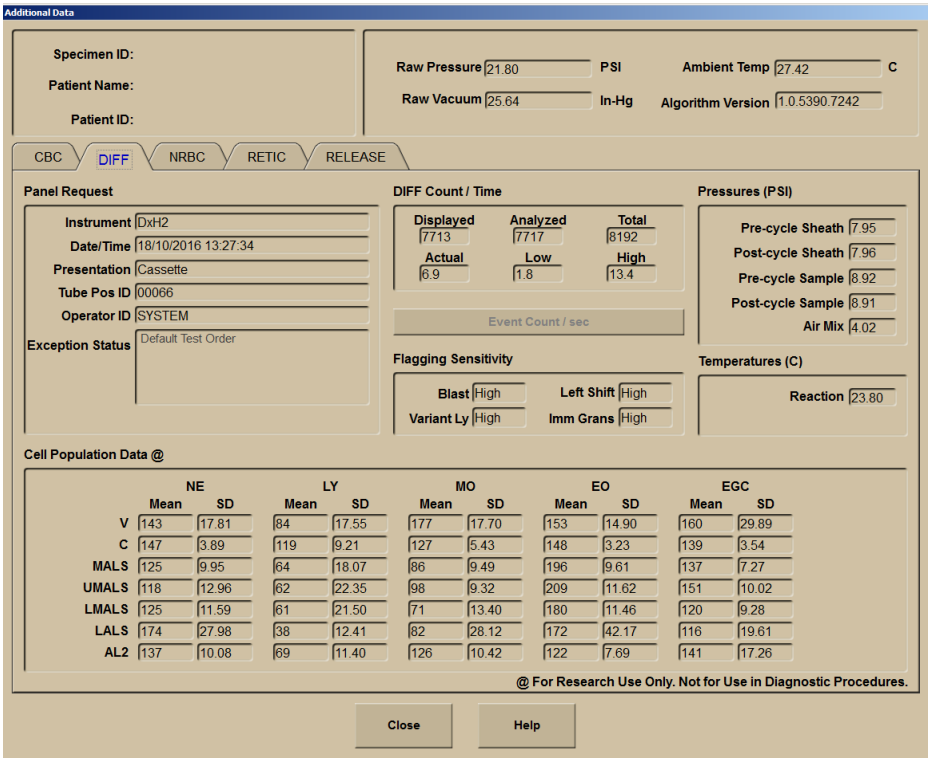
Slika 12: Prikaz rasapa svjetlosti na hematološkom brojaču Beckman Coulter DxH800; 1-donje elektrode, 2-gornje elektrode, 3-gubitak središnje svjetlosti (ALL, engl. Axial light loss), 4-rasap svjetlosti donjeg kuta (LALS, engl. Low angle light scatter), 5-rasap svjetlosti donjeg središnjeg kuta, (LMALS, engl. Lower median angle light scatter), 6-rasap svjetlosti gornjeg središnjeg kuta (UMALS, engl. Upper median angle light scatter), 7-zbroj regija UMALS i LMALS (MALS, engl. Medium angle light scatter); preuzeto iz UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System Instructions for Use, 2009.

Tablica 5: Parametri rasapa svjetlosti s pripadajućim kutovima

Oznaka	Kut
MALS	UMALS+LMALS
UMALS	20-42°
LMALS	10-20°
LALS	5,1°

**LALS (engl. Low angle light scatter), LMALS (engl. Lower median angle light scatter), UMALS (engl. Upper median angle light scatter), MALS (engl. Medium angle light scatter)*

Primjena tehnologije VCS na automatskom hematološkom analizatoru Beckman Coulter DxH800 omogućila je dobivanje dodatnih informacija o leukocitnim subpopulacijama koje su dostupne na istraživačkom sučelju (engl. Research screen). Među ostalim opisanim parametrima, analizator daje vrijednost srednjeg volumena limfocita (MCV Ly) i srednjeg volumena monocita (MCV Mo). Nakon analize skupljeni su dodatni podatci MCV Ly i MCV Mo s istraživačkog sučelja za skupinu bolesnika i kontrolnu skupinu (slika 13).



Slika 13: Prikaz korisničkog sučelja Beckman Coulter DxH800 automatskog analizatora (preuzeto iz UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System Instructions for Use, 2009)

3.2.2. Brzina sedimentacije eritrocita

Ovom metodom se mjeri brzina spuštanja stupca eritrocita venske krvi u graduiranoj epruveti tijekom jednog sata. Epruvete se postavljaju uspravno u posebno dizajnirane, graduirane stalke i ostavljaju sat vremena. Tijekom sat vremena dolazi do taloženja krvnih stanica tj. stvaranja tzv. «reuleaux» formacija eritrocita, proces povratnog nakupljanja eritrocita u veće ili manje nakupine. Nakon postavljanja graduiranog stalka na meniskus očitava se razina sedimentacije.

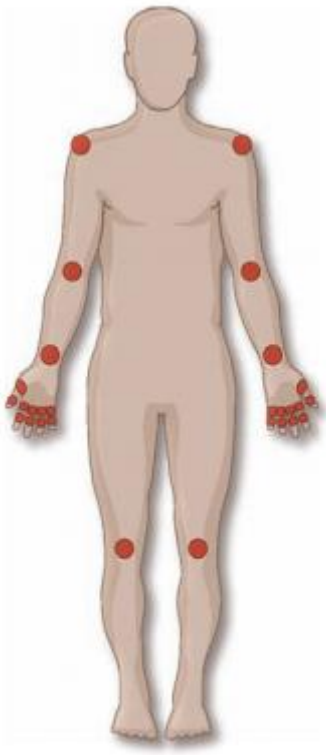
3.2.3. C-reaktivni protein

Analiza uzoraka za CRP provedena je na Cobas c501 automatskom biokemijskom analizatoru (Roche, Švicarska) imunoturbidimetrijskom metodom. Načelo metode temelji se na nastanku kompleksa između analita i puferiranog protutijela iz reagensa što rezultira zamućenjem otopine. Pri prolasku zrake svjetlosti kroz otopinu intenzitet svjetlosti se smanjuje i svjetlost se raspršuje. Kod turbidimetrije mjeri se prijenos primarne svjetlosti: $T = I/I_0$, pri čemu je I_0 intenzitet ulazne svjetlosti, a I intenzitet svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak. Fotodetektor je smješten u smjeru prolaska zrake svjetlosti pod kutom od 0° (180°). Koncentracija analita određuje se interpolacijom iz baždarne krivulje (Dodig, 2015; Štraus i sur., 1997).

Pri izvođenju ovog testa CRP iz uzorka aglutinira s lateks česticama obloženim monoklonalnim anti-CRP antitijelima. Radne otopine uključuju otopinu lateks čestica s vezanim monoklonalnim antitijelima i TRIS pufer.

3.2.4. DAS (engl. Disease Activity Score)

DAS je kombinirani indeks koji se koristi za procjenu aktivnosti bolesti kod bolesnika oboljelih od RA. Postoje brojne inačice DAS-a od kojih se danas najčešće koristi DAS28 koji uključuje podatak o stanju 28 zglobova (slika 15), vrijednosti brzine SE, CRP-a i bolesnikovu procjenu stanja (VAS, engl. Visual Analogue Scale). Zglobovi se opisuju kao bolni (t28) ili natečeni (sw28) (http://www.iche.edu).



Slika 14: Prikaz zglobova koji ulaze u izračun DAS28 (preuzeto s http://www.das-score.nl/das28/images/28jointform.jpg)

DAS28 se računa po sljedećoj formuli:

$$DAS28 = 0{,}56 * \overline{t28} + 0{,}28 * \overline{sw28} + 0{,}70 * \ln SE + 0{,}014 * VAS$$

Vrijednost DAS28 kreće se od 0 do 10 te je temelj procjene stanja bolesnika. Ako je DAS28>5,1 bolesti je visoke aktivnosti, a vrijednost DAS28<2,6 označava remisiju bolesti. O slaboj aktivnosti bolesti govorimo ako je DAS28<3,2 (Wells i sur., 2009)

3.3. Statistička analiza

U obradi podataka i pri prikazivanju rezultata korišteni su računalni programi MedCalc Statistical Software, ver. 14.8.1 (Mariakerke, Belgija) i Excel 2016, Microsoft Office Proffesional Plus. Za ispitivanje tipa razdiobe kvantitativnih varijabli korišten je Kolmogorov-Smirnovljev test. Rezultat ovog testa se prikazuju P vrijednost na temelju koje prihvaćamo ili odbacujemo normalnu distribuciju podataka. Ako je P veći od 0,05 podatci slijede normalnu distribuciju, a ako je P manji od 0,05 ova hipoteza se treba odbaciti. Podatci s normalnom razdiobom prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a

podatci s asimetričnom raspodjelom medijanom i rasponom. Ukoliko podatci slijede normalnu raspodjelu daljnja obrada uključivala je parametrijske testove, npr. Studentov t-test ili u slučaju asimetrične raspodjele Mann-Whitney test.

Taj test se koristi kao provjera nul-hipoteze da je razlika između dva uzorka jednaka nuli. Ako je $P<0,05$, nul-hipoteza se odbacuje i zaključak je da se dva podatka razlikuju. Za ispitivanje povezanosti varijabli koristi se izračun koeficijenta korelacije. Korelacija opisuje sukladnost vrijednosti dviju skupina podataka. Ovisno o raspodjeli podataka koristi se ili Pearsonov (r) ili Spermanov (ρ) koeficijent korelacije, uz koji se računa statistička značajnost P. Vrijednosti $P<0,05$ smatraju se statistički značajnima. Koeficijenti korelacije tumače se prema Coltonu i prikazani su u tablici 6. Koeficijent korelacije može imati vrijednosti od -1 do +1. Pozitivna korelacija podrazumijeva koeficijent r od 0 do 1 i označava sukladan rast vrijednosti podataka unutar skupova. Negativna korelacija podrazumijeva koeficijent r od -1 do 0 i označava rast vrijednosti jedne varijable uz pad druge varijable (Udovičić i sur., 2007).

Tablica 6: Tumačenje vrijednosti koeficijenta korelacije po Coltonu

KOEFICIJENT KORELACIJE	POVEZANOST
0 do ±0,25	Nema povezanosti
±0,26 do ±0,50	Slaba povezanost
±0,51 do ±0,75	Umjerena do dobra povezanost
±0,76 do ±1	Dobra do izvrsna povezanost

Za procjenu dijagnostičke točnosti upotrjebljena je ROC analiza (engl Receiver Operating Characteristics Analysis). Dijagnostička specifičnost i osjetljivost mijenjaju se ovisno o izboru graničnih vrijednosti. Njihov odnos najbolje se prikazuje ROC krivuljom. Ona nastaje kao grafički prikaz parova vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti. Na apscisi se nalazi dijagnostička specifičnost, a na ordinati dijagnostička osjetljivost. Oblik i površina ispod ROC krivulje daju informaciju o dijagnostičkoj učinkovitosti pretrage. Točnost je veća što je krivulja bliže gornjem lijevom kutu grafa i korelira s površinom ispod krivulje.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

4.1.1. Deskriptivna statistika

Na temelju pregleda medicinske dokumentacije prikupljeni su demografski i klinički podatci o bolesnicima (tablica 7).

Tablica 7: Podjela ispitanika po skupinama i podskupinama te prikaz demografskih i kliničkih podataka bolesnika

		Kontrolna skupina	RA	Aktivna bolest	Remisija
Ukupan broj bolesnika		32	84	30	59
SPOL	**M**	7 (21,9%)	25 (29,8%)	12 (40,0%)	16 (27,1%)
	Ž	25 (78,1%)	59 (70,2%)	18 (60,0%)	43 (72,9%)
Dob		39,3±10,6†	51,6±14,7†	50,7±16,8†	51,9±13,9†

† srednja vrijednost ± standardna devijacija

U svim uzorcima napravljena je pretraga KKS. Rezultati MCV Ly i MCV Mo u kontrolnoj skupini prikazani su u tablici 8, a rezultati MCV Ly, MCV Mo, CRP, SE i DAS28 u skupinama i podskupinama bolesnika prikazani su u tablicama 8 i 9.

Tablica 8: Deskriptivna statistika dobivenih rezultata mjerenja po skupinama (kontrolna skupina i RA)

	Kontrolna skupina	RA
CRP (mg/L)	-	0,7 (0,2-78,4)‡
SE (mm/h)	-	10,0 (1,0-100,0)‡
DAS28	-	2,2 (0,0-6,8)‡
MCV Ly (fL)	84,0 (80,0-92,0)‡	88,8 ± 4,2†
MCV Mo (fL)	166,5 ±3,6†	172,8 ± 6,5†

† srednja vrijednost ± standardna devijacija; ‡ medijan (raspon)

Tablica 9: Deskriptivna statistika dobivenih rezultata mjerenja po podskupinama (aktivna bolest i remisija)

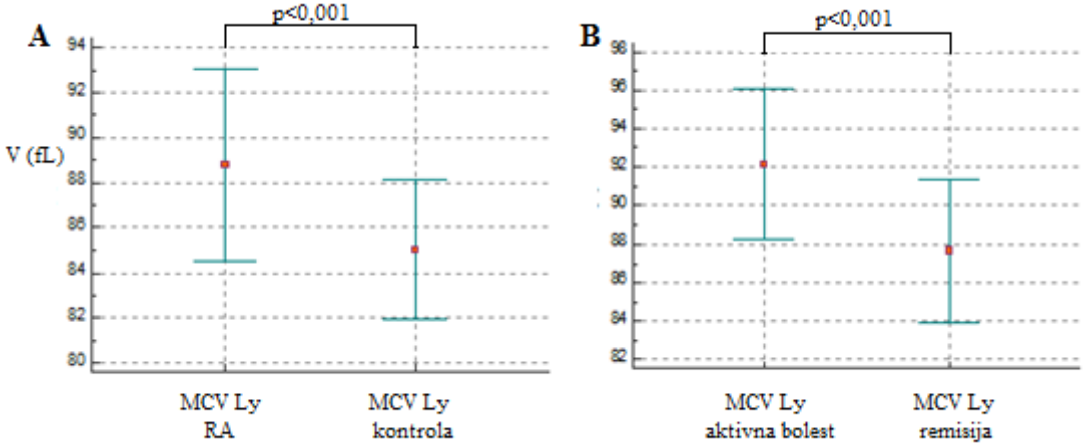
	Aktivna bolest	Remisija
CRP (mg/L)	17,5 (5,2-78,4)‡	0,5 (0,2-4,8)‡
SE (mm/h)	55,3±22,0†	8,0 (1,0-28,0)‡
DAS28	4,0±1,1†	2,0 (0,0-4,8)‡
MCV Ly (fL)	92,0 (81,0-102,0)‡	88,0 (77,0-95,0)‡
MCV Mo (fL)	176,5 (170,0-195,0)‡	171,0 ±5,4†

† srednja vrijednost ± standardna devijacija; ‡ medijan (raspon)

4.1.2. Ovisnost prosječnog volumena limfocita o stadiju RA

Rezultati mjerenja analizirani su Mann-Whitney testom u skupinama i podskupinama ispitanika. Ovim testom je provjerena hipoteza da se razlikom u prosječnom volumenu limfocita mogu razlučiti bolesnici koji boluju od reumatoidnog artritisa od kontrolne skupine i da se istim ovim parametrom može razlikovati aktivna bolest od remisije.

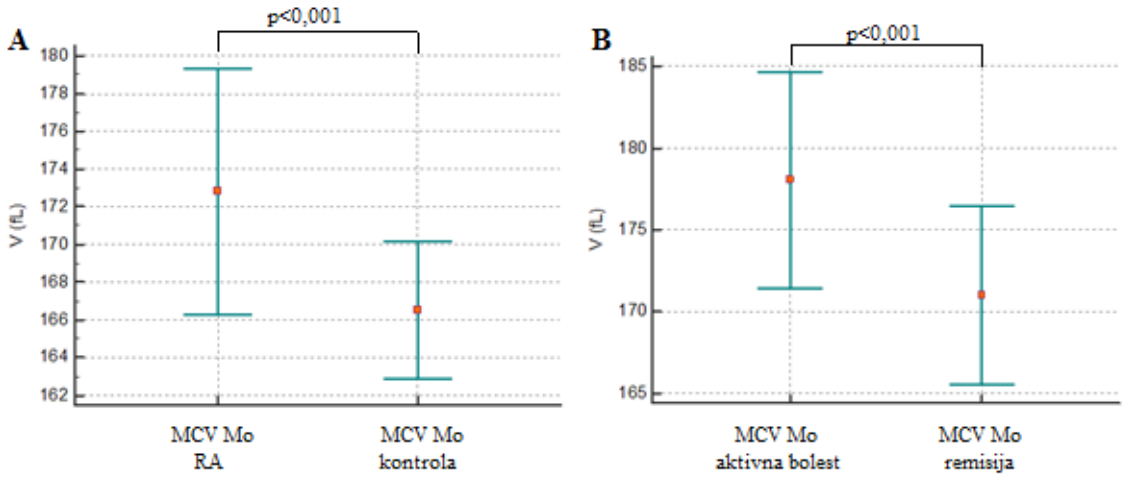
Usporedbom MCV Ly kontrolne skupine i skupine bolesnika dobivena je P vrijednost <0,001. Za isti parametar usporedbom podskupina aktivne bolesti i remisije P vrijednost iznosi <0,001. Slika 15 prikazuje raspodjelu rezultata MCV Ly u skupini bolesnika i kontrolnoj skupini (A) te u dvije podskupine bolesnika (B).



Slika 15: Raspodjela rezultata MCV Ly po skupinama (A) i podskupinama (B), P<0,0001

4.1.3. Ovisnost prosječnog volumena monocita o stadiju RA

Uspoređene su vrijednosti MCV Mo kontrolne skupine i skupine bolesnika i dobivena je P vrijednost <0,001. Za isti parametar usporedbom vrijednosti podskupina aktivne bolesti i remisije dobivena je P vrijednost <0,001. Slika 16 prikazuje raspodjelu rezultata MCV Mo u skupini bolesnika i kontrolnoj skupini (A) te u dvije podskupine bolesnika (B).



Slika 16: Raspodjela rezultata MCV Mo po skupinama (A) i podskupinama (B), P<0,001

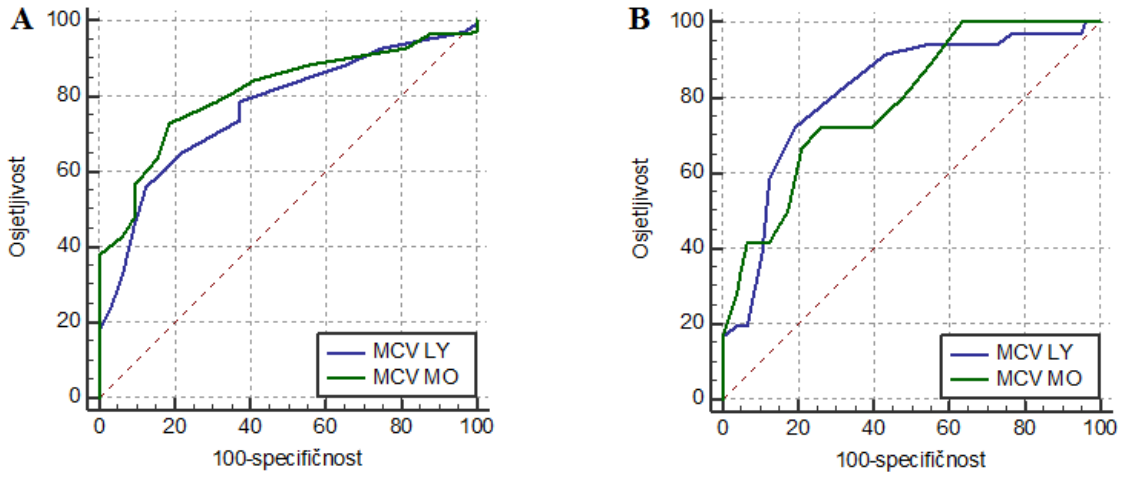
4.1.4. Dijagnostička specifičnost i osjetljivost

Za procjenu dijagnostičkih mogućnosti parametara MCV Ly i MCV Mo u razlikovanju skupine bolesnika i zdravih ispitanika te podskupina aktivne bolesti i remisije provedena je ROC analiza. Rezultati su prikazani u tablici 10. Na slici 18 su prikazane pripadajuće ROC krivulje.

Tablica 10: Rezultati ROC analize

Parametar	AUC (95%CI)	P	Granična vrijednost	Osjetljivost (%)	Specifičnost (%)
Razlikovanje skupine bolesnika i zdravih ispitanika					
MCV Ly	0,767 (0,697-0,828)	<0,001	>88	55,7	87,5
MCV Mo	0,811 (0,744-0,866)	<0,001	>169	72,9	81,2
Razlikovanje podskupina aktivne bolesti i remisije					
MCV Ly	0,817 (0,742-0,877)	<0,001	>90	72,2	80,8
MCV Mo	0,788 (0,711-0,853)	<0,001	>174	72,2	74,0

Slika 18 prikazuje dijagnostičku točnost MCV Ly i MCV Mo u definiranju bolesti (A) i prikazuje točnost razlikovanja aktivne bolesti od remisije (B).



Slika 17: Grafički prikaz ROC krivulja: dijagnostička točnost MCV Ly i MCV Mo (A); dijagnostička točnost MCV Ly i MCV Mo u razlikovanju aktivnog oblika bolesti i remisije (B)

MCV Ly s osjetljivošću od 55,7% i specifičnošću od 87,5% točno razlikuje oboljele od zdravih osoba, uz granični kriterij >88. Točnost razlikovanja aktivne bolesti od remisije uz kriterij >90 je s osjetljivošću od 72,2% i specifičnošću od 80,8%. MCV Mo s osjetljivošću od 72,9% i specifičnošću od 81,2% točno razlikuje oboljele od zdravih osoba, uz granični kriterij

>169. Točnost razlikovanja aktivne bolesti od remisije uz kriterij >174 je s osjetljivošću od 72,2% i specifičnošću od 74,0%.

4.1.5. Korelacija MCV Ly i MCV Mo s CRP i DAS28

Tablica 11. prikazuje korelaciju parametara MCV Ly i MCV Mo s CRP i DAS28 u skupini RA i u podskupinama.

Tablica 11: Korelacija vrijednosti MCV Ly i MCV Mo s CRP i DAS28 u skupinama i podskupinama bolesnika

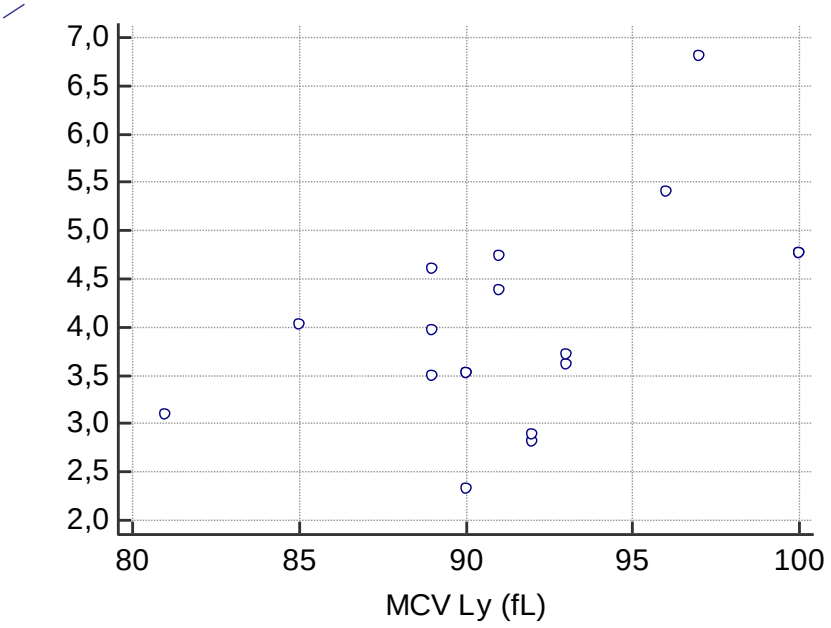
		N	MCV Ly ρ (P)	MCV Mo ρ (P)
Reumatoidni artritis	CRP	140	**0,43 (<0,001)**	**0,34 (<0,001)**
	DAS28	113	0,16 (0,093)	0,13 (0,177)
Aktivna bolest	CRP	36	-0,03 (0,885)	0,08 (0,631)
	DAS28	18	**0,48 (0,044)**	0,46 (0,058)
Remisija	CRP	104	0,10 (0,297)	-0,02 (0,863)
	DAS28	95	-0,07 (0,514)	-0,11 (0,280)

ρ – Spearmanov koeficijent korelacije; P – statistička značajnost; N – broj uzoraka

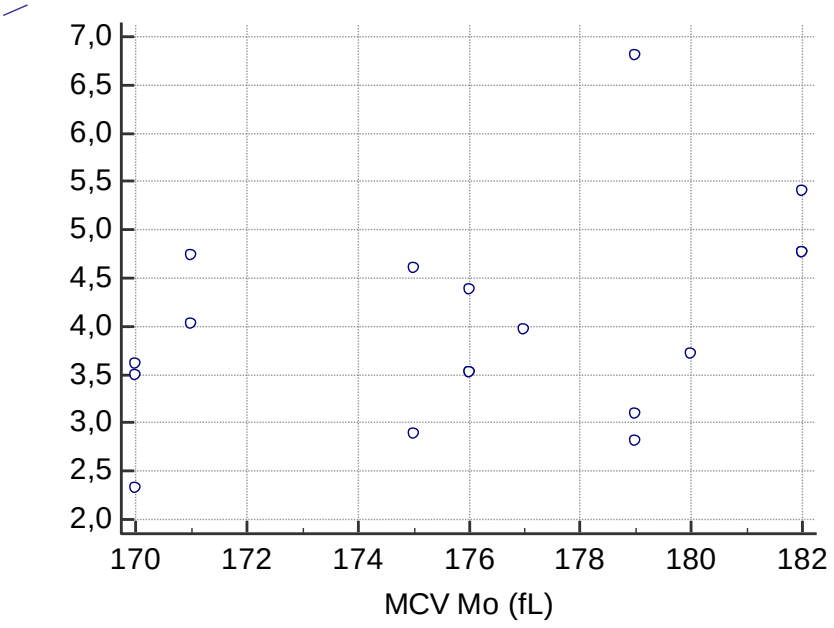
Statistički značajni korelacijski koeficijenti dobiveni su korelacijom vrijednosti parametara CRP i MCV Ly, CRP i MCV Mo u skupini bolesnika te korelacijom vrijednosti parametara DAS28 i MCV Ly u podskupini aktivna bolest.

Korelacijom vrijednosti parametara DAS28 i CRP u skupini bolesnika dobiven je $\rho=0,44$ uz $P<0,001$, dok korelacijom u podskupinama bolesnika nije dobivena statistički značajna korelacija.

S obzirom da je DAS28 parametar koji se računa kao mjera aktivnosti bolesti, cilj je bio usporediti vrijednosti DAS28 s prosječnim volumenom stanica koje se ispituju. Usporedbom MCV Ly s DAS28 uzoraka s aktivnim reumatoidnim artritisom, izračunati korelacijski koeficijent iznosi 0,48 uz P=0,044. Grafički prikazi podataka korištenih za izračun koeficijenta korelacije prikazani su na slikama 18 i 19.

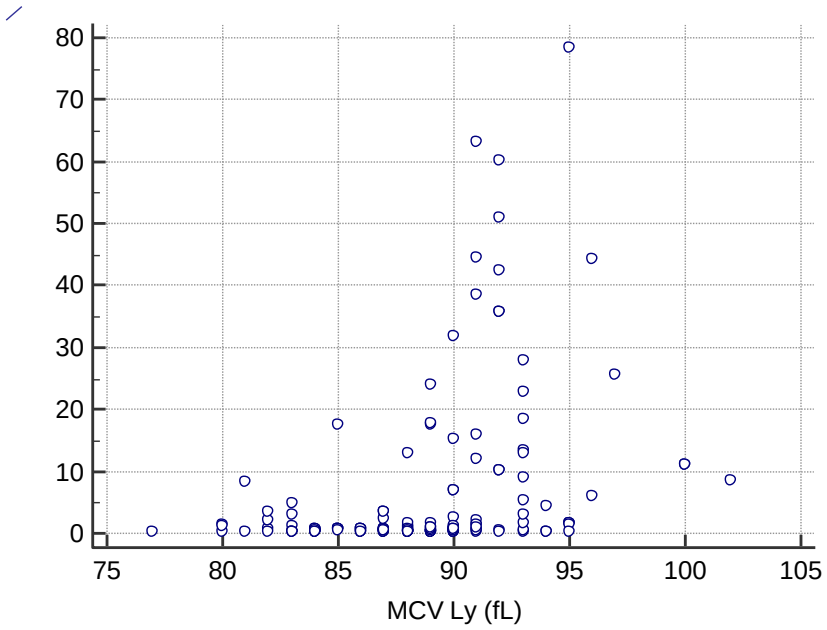


Slika 18: Grafički prikaz korelacije MCV LY s DAS28 u podskupini aktivna bolest (P=0,044; ρ=0,48)

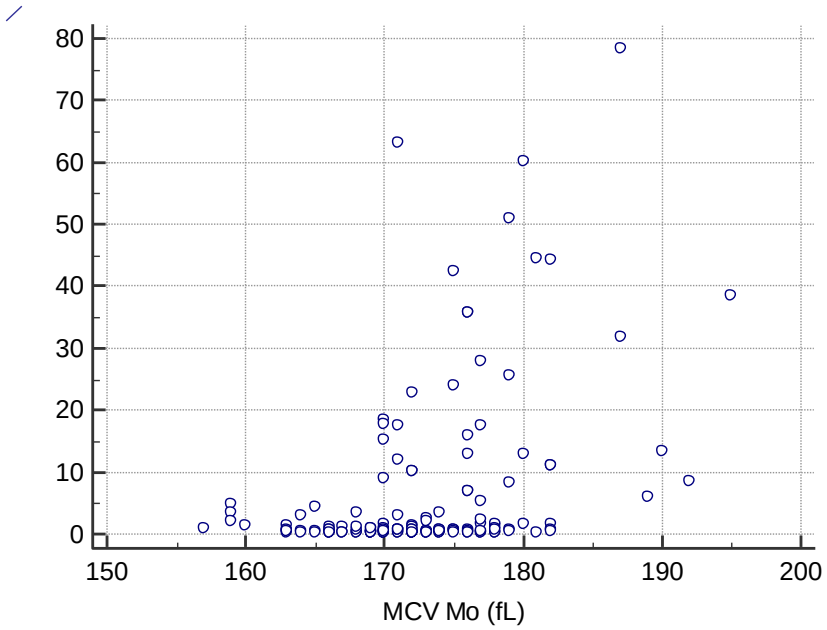


Slika 19: Grafički prikaz korelacije MCV Mo s DAS28 u podskupini aktivna bolest (P=0,058; ρ=0,46)

S obzirom da je sedimentacija uračunata u izračun DAS28 napravljena je korelacija MCV Ly i MCV Mo s CRP-om. Rezultati su prikazani na slikama 21 i 22.



Slika 20: Grafički prikaz korelacije MCV Ly s CRP u skupini bolesnika (P<0,001; ρ=0,43)



Slika 21: Grafički prikaz korelacije MCV Mo s CRP u skupini bolesnika (P<0,001; ρ=0,34)

4.1.6. Usporedba rezultata mjerenja ovisno o vrsti bioloških lijekova

Bolesnici su također podijeljeni ovisno o biološkoj terapiji koju primaju. Ukupan broj bolesnika koji primaju inhibitore TNF-α je 32, a bolesnika koji primaju inhibitor IL-6 je 78. Prosječne vrijednosti MCV Ly i MCV Mo prikazane su u tablici 12.

Tablica 12: Deskriptivna statistika dobivenih vrijednosti parametara MCV Ly i MCV Mo ovisno o tipu biološke terapije

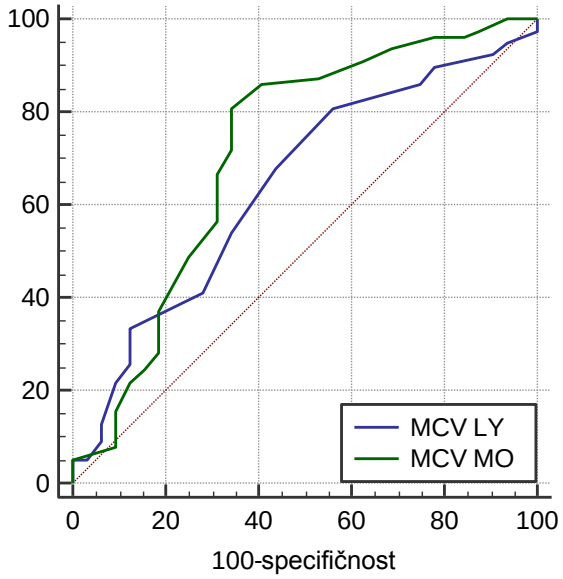
	Inhibitori TNF-α (N=38)	**Inhibitori IL-6 (N=72)**
MCV Ly	89,5 ±3,4†	88,0 (77,0-97,0)‡
MCV Mo	175,3 ± 7,0†	170,6 ± 5,2†

† srednja vrijednost ± standardna devijacija; ‡ medijan (raspon)

Usporedbom vrijednosti podataka u podskupinama dobivena je statistički značajna razlika u vrijednosti MCV Ly (P=0,002) i MCV Mo (P=0,020). Vrijednosti MCV Ly i MCV Mo statistički su značajno niže u podskupini bolesnika na terapiji s anti-TNF-α u odnosu na bolesnike koji su na terapiji s anti-IL-6. ROC krivuljom provjerena je osjetljivost i specifičnost ovih parametara (slika 19), a rezultati ROC analize prikazani su u tablici 13.

Tablica 13: Rezultati ROC analize

Parametar	**AUC (95%CI)**	**P**	**Granična vrijednost**	**Osjetljivost (%)**	**Specifičnost (%)**
Razlikovanje skupine bolesnika na terapiji anti-TNFα i anti-IL6					
MCV Ly	0,641 (0,544-0,730)	0,016	>90	43,75	80,77
MCV Mo	0,714 (0,620-0,796)	0,005	>174	65,62	80,77



Slika 22: Grafički prikaz ROC krivulja: dijagnostička točnost MCV Ly i MCV Mo u razlikovanju biološke terapije

4.2. Rasprava

Prethodna istraživanja pokazala su da promjene u morfologiji leukocita u raznim kliničkim stanjima mogu biti kvantitativno izmjerene na hematološkom brojaču uz tehnologiju VCS. Tehnologija VCS je omogućila istraživanja ovih parametara u brojnim kliničkim stanjima. U slučaju upalnih bolesti ciljevi su bili prvenstveno definiranje upalnog stanja. Park i sur. opisali su korisnost prosječnog volumena stanica u dijagnosticiranju sepse, stanja za koje je vodeći problem upravo rana dijagnostika (Sung-Eun i sur., 2012; Mardi i sur., 2009). Xu D. povezivao je VCS parametre sa stanjima s potpuno drugačijom patologijom, od virusnih infekcija do kroničnih leukemija. Yu Y. i sur. povezali su ove parametre upravo s dijagnosticiranjem reumatoidnog artritisa. Prosječni volumeni stanica uspješno su povezani s aktivacijom akutne faze što je bio i temelj ovog istraživanja uz dodatnu procjenu vrijednosti ovih parametara u definiranju aktivnosti bolesti. Pri procjeni stanja bolesnika koriste se osnovne pretrage provjere parametara akutne faze, poput određivanja koncentracije CRP-a, brzine SE i KKS te brojni indeksi aktivnosti bolesti kao što je DAS28. U kliničkoj praksi naglasak se, uz olakšavanje simptoma bolesti, stavlja na smanjivanje akutnog odgovora organizma što je omogućeno razvojem lijekova. Točno određivanje aktivnosti bolesti omogućava brzu reakciju kliničara i uspješnije liječenje.

Cilj rada bio je utvrditi korisnost MCV Ly i MCV Mo u određivanju aktivnosti bolesti i uspješnosti terapije. Vrijednosti prosječnog volumena limfocita statistički se značajno razlikuju u skupinama i podskupinama bolesnika. U slučaju reumatoidnog artritisa vrijednosti MCV Ly iznose 88,8 ± 4,2 u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine koje iznose 84,0 (80,0-92,0) uz $P<0,001$. MCV Mo kod bolesnika s RA iznosi 172,8±6,5 u usporedbi s kontrolnom skupinom čije vrijednosti iznose 166,5±3,6 uz $P<0,001$. Za oba parametra postoji statistički značajna razlika u vrijednostima po skupinama bolesnika. Vrijednosti MCV Ly u aktivnoj bolesti (92,0 (81,0-102,0)) statistički se značajno razlikuju od vrijednosti u remisiji (88,0 (77,0-95,0)) uz $P<0,001$. Također, vrijednosti MCV Mo u aktivnoj bolesti (176,5 (170,0-195,0)) statistički se značajno razlikuju od vrijednosti u remisiji (171,0±5,4)) uz $P<0,001$. Dakle, postoji statistički značajna razlika u vrijednostima u podskupinama bolesnika. ROC krivuljama procijenjena je dijagnostička točnost MCV Ly i MCV Mo te je MCV Mo pokazao nešto bolju osjetljivost (72,9%), a MCV Ly bolju specifičnost (87,50%) za razlikovanje skupine bolesnika i zdravih ispitanika. Za definiranje aktivne bolesti MCV Ly pokazuje bolju osjetljivost i specifičnost za razliku od MCV Mo.

Analiza korelacije pokazala je pozitivnu korelaciju MCV Ly (ρ =0,43) i MCV Mo (ρ =0,34) s CRP-om u skupini bolesnika s dijagnosticiranim RA (P<0,001). U podskupini aktivna bolest, korelacijom MCV Ly i DAS28 dobivena je pozitivna korelacija (ρ=0,48) uz P=0,044. Ostali parametri aktivnosti bolesti ne pokazuju statistički značajnu korelaciju s MCV Ly i MCV Mo. Ovi rezultati u skladu su s već provedenim istraživanjima u području upale. Iz rezultata je vidljivo da promjene u veličini stanica odgovaraju aktivaciji upalnog procesa te da je moguće razlučiti upalno stanje i remisiju upravo koristeći MCV Ly i MCV Mo. Usporedba MCV Ly i MCV Mo u podskupinama bolesnika s CRP-om kao biljegom akutne faze nije pokazala statistički značajnu korelaciju. Postavljena hipoteza da će MCV Ly i MCV Mo pozitivno korelirati s CRP-om ovisno o aktivnosti bolesti u skladu je s prethodnim istraživanjima i patologijom same bolesti, ali je u ovom slučaju odbačena. CRP se sintetizira u organizmu i njegova vrijednost proporcionalna je odgovoru akutne faze, no u ovom slučaju ne smije se gledati kao jedinstvena cjelina. Svaki bolesnik koji je ušao u remisijsku fazu bolesti već je prošao brojne i različite terapije koje su imale različite ciljeve. Svaka terapija, bilo biološka terapija ili terapija DMARD, utječe na stanične mehanizme sinteze proteina. Uz to, bolesnici nisu bili u istoj fazi terapije, a svaka nova primjena ciklusa terapije mijenja odgovor organizma. Može se zaključiti da uz CRP i MCV Ly i MCV Mo uspješno definiraju akutnu fazu, ali zbog mehanizma djelovanja lijekova u ovako određenim skupinama i podskupinama između njih ne postoji statistički značajna korelacija.

Klinički izbor terapije kreće od DMARD, zatim se prelazi na anti-TNF-α te konačno na anti-IL6. Zbog poznatog mehanizma djelovanja lijekova opisanog ranije, cilj je bio utvrditi postoji li razlika između vrsta biološke terapije koja je vidljiva u odgovoru organizma u obliku vrijednosti MCV Ly i MCV Mo. Analizom podataka vidljivo je da postoji statistički značajna razlika u vrijednostima MCV Ly u podskupinama anti-TNF-α i anti- IL6 (P=0,002), kao i u vrijednostima MCV Mo (P=0,020). Ova informacija korisna je kao smjer istraživanja učinkovitosti terapije kao i predviđanja lošeg odgovora na terapiju. Također, rezultati su u skladu s mehanizmom djelovanja inhibitora IL-6.

Posebne vrijednosti parametara MCV Ly i MCV Mo su pristupačnost i cijena, jer se dobiju u sklopu jednostavne i jeftine pretrage KKS.

5. ZAKLJUČCI

1. Vrijednosti MCV Ly i MCV Mo statistički su značajno više kod bolesnika s dijagnosticiranim RA u odnosu na kontrolnu skupinu
2. Vrijednosti MCV Ly i MCV Mo statistički su značajno više kod bolesnika s aktivnim RA u odnosu na bolesnike u remisiji
3. Uporabom vrijednosti MCV Ly moguće je razlikovati skupinu bolesnika od skupine zdravih ispitanika s osjetljivošću od 55,7% i specifičnošću od 87,5%, uz granični kriterij >88.
4. Uporabom vrijednosti MCV Ly moguće je razlikovati bolesnike s aktivnim oblikom bolesti od bolesnika u remisiji s osjetljivošću od 72,2% i specifičnošću od 80,8% uz granični kriterij >90.
5. Uporabom vrijednosti MCV Mo moguće je razlikovati skupinu bolesnika od skupine zdravih ispitanika s osjetljivošću od 72,9% i specifičnošću od 81,2%, uz granični kriterij >169.
6. Uporabom vrijednosti MCV Mo moguće je razlikovati bolesnike s aktivnim oblikom bolesti od bolesnika u remisiji s osjetljivošću od 72,2% i specifičnošću od 74,0% uz kriterij >174.
7. MCV Ly pozitivno korelira s vrijednostima CRP-a i DAS28.
8. MCV Mo pozitivno korelira s vrijednostima CRP-a.
9. Vrijednosti MCV Ly i MCV Mo statistički su značajno više kod bolesnika na terapiji inhibitorima TNF-α u odnosu na bolesnike na terapiji inhibitorima IL-6.

6. LITERATURA

1. Aletaha D i sur. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. Arthritis & Rheumatism,2010, 2569-2581
2. Anderson S. Anderson's Atlas of Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003
3. Andreis I. Imunologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2010.
4. https://www.studyblue.com/notes/note/n/case-2/deck/6033043, pristupljeno 05.05.2016.
5. Čikeš N, Ćurković B. Reumatske bolesti. U: Interna medicina. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, urednici, Zagreb,Naklada Ljevak, 2008.
6. Ćurković B. Procjena aktivnosti bolesti i procjena ishoda u reumatoidnom artritisu. Fiz. Rehabil. Med. 2007, 17-22
7. DAS28 Newsletter, 2009., http://www.iche.edu, pristupljeno 4.9.2016.
8. Dodig S. Imunokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015.
9. Katzung B, Masters S, Trevor A. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011.
10. Labar B, Hauptman E. Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2007.
11. Lee, A, Kim S. Mean Cell Volumes of Neutrophils and Monocytes Are Promising Markers of Sepsis in Elderly Patients. Blood Res, 2013.
12. Mardi, D, Fwity B, Lobmann R, Ambrosch A. Mean Cell Volume of Neutrophils and Monocytes Compared with C-reactive Protein, Interleukin-6 and White Blood Cell Count for Prediction of Sepsis and Nonsystemic Bacterial Infections. International Journal of Laboratory Hematology, 2009
13. MSD priručnik dijagnostike i terapije. http://www.msd-prirucnici.placebo.hr, 2014, pristupljeno 1.5.2016.
14. Paleolog E. Vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence? Int J Exp Path, 2009, 249-261
15. Rheumatoid arthritis. http://www.medicinenet.com/rheumatoid_arthritis/article.htm, pristupljeno 01.08.2016.
16. Roitt I, Male D, Brostoff J, Roth D. Immunology. Elsevier, 2013.

17. Sung-Eun L, Lim J, Kim Y, Min W, Han K. Leukocyte Cell Population Analysis From the Coulter Automatic Blood Cell Analyzer DxH800 to Monitor the Effect of G-CSF. J. Clin. Lab. Anal. 2012. 194-199
18. Suresh P, Minal J, S Rao P, Ballal K, Sridevi H, Padyana M. Volume conductivity and Scatter Parameters as an Indicator of Acute Bacterial Infections by the Automated Haematology Analyser. Journal of Clinical and DiagnosticResearch, 2016, EC01-EC03
19. Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Zagreb, Medicinska naklada, 1997.
20. Tešija Kuna, A., Žirović, M. Antitijela na citrulinirane proteine/peptide u reumatoidnom artritisu: što smo dosad naučili?. Biochemia 2008, 275-290
21. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? Biochemia Medica 2007;17(1):10-5.
22. UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System Instructions for Use, Beckman Coulter Inc. 2009
23. Wegner N, Lundberg K, Kinlosch A. Autoimmunity to specific citrulinater proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. Imuunolog Rev, 2010, 34-54
24. Wells G, Becker J-C, Teng J, Dougados M, Schiff M, Smolen J, Aletaha D, Van Riel PLCM. Validationof the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Anainst Rheumatism response criteria based on C-reactiove protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erytrocyte sedimentation rate. Ann Rheum Dis 2009, 954-960
25. Xu D. Clinical Applications of Leukocyte Morphological Parameters. Int J Path Clin Res, 2015.
26. Yu Y, Zhu L.-C.,. Xu S.-Z, Yao Y.-M. Mean Lymphocyte Volume and Mean Monocyte Volume Are Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. Int. Jnl. Lab. Hem. 2015.
27. http://labmed.hallym.ac.kr/hematol/Normal-PBcells.htm, 2000.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Reumatoidni artritis je kronična autoimuna bolest od koje boluje otprilike 1% populacije. Dijagnostika ove bolesti temelji se na brojnim metodama uključujući radiološke i laboratorijske pretrage te opću kliničku sliku. Laboratorijska dijagnostika uključuje KKS, upalne parametre (brzina SE, CRP) te imunološke pretrage na različita antitijela, npr. anti-CCP. Uz pretrage krvi, analizira se i sinovijalna tekućina. Iako ukupan broj leukocita s podatcima o udjelu pojedinih vrsta leukocita daje vrijednu informaiju o aktivnosti bolesti, tehnologija VCS pruža informaciju o svakoj pojedinačnoj stanici i stoga biokemičarima i kliničarima omogućava novi uvid u patofiziologiju upalnog procesa. U ovom radu proučene su vrijednosti prosječnog volumena limfocita i monocita u definiranju aktivnosti bolesti korištenjem VCS tehnologije automatskog analizatora na ukupno 140 uzoraka bolesnika i 32 uzorka ispitanika u kontrolnoj skupini.

Analizom podataka dobivena je statistički značajna razlika između vrijednosti MCV Ly i MCV Mo kontrolne skupine ispitanika i bolesnika s dijagnosticiranim reumatoidnim artritisom te dobra korelacija s CRP-om i DAS28 kod aktivne bolesti. Također, dobivena je statistički značajna razlika u vrijednostima MCV Ly i MCV Mo u podskupinama aktivnog reumatoidnog artritisa i remisije bolesti. Uz definiranje aktivnosti bolesti dobivene su statistički značajno više vrijednosti MCV Ly i MCV Mo kod bolesnika na terapiji inhibitorima TNF-α u odnosu na bolesnike na terapiji inhibitorima IL-6. Dobiveni rezultati potvrđuju MCV Ly i MCV Mo kao potencijalne nove biljege aktivnosti bolesti i vrijedna su tema daljnjih istraživanja u ranoj dijagnostici, praćenju aktivnosti bolesti i terapije u različitim upalnim bolestima uključujući reumatoidni artritis.

SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease with a prevelance of around 1% in the world. Characterized by joint swelling, joint tenderness, and synovial hyperplasia, inflammatory process eventually leads to cartilage and bone destruction, severe disability and premature mortality. Differencial diagnosis is based on multiple diagnostic methods, including laboratory tests, radiography or other imaging techniques. Along with specific inflammatory markers such as CRP or ESR, laboratory tests include specific antibodies (anti-CCP) for RA diagnostics.

Although total WBC count with cell population data gives a valuable information about disease activity, VCS technology gives information about each individual leukocyte cell population therefore giving biochemists a new insight to the pathology of inflammatory process. In this masters thesis, the VCS parameters mean lymphocyte volume (MCV Ly) and mean monocyte volume (MCV Mo) acquired from a Beckman Coulter DxH800 haematology analyzer were investigated to determine which of them could indicate the activation of inflammatory process in RA. Total number of samples was 140 in the test group and 32 in control group. Out of 140 samples, 34 were patients with active rheumatoid arthritis and 104 were in remission. The results are as follows: MCV Ly is significantly increased in patients with RA compared with control group as well as in patients with active RA compared with those in remission. MCV Mo is also significantly increased in patients with RA compared with control group as well as in patients with active RA compared with those in remission. There is a positive correlation between MCV Ly and MCV Mo and CRP and DAS28 in active rheumatoid arthritis.

MCV Ly and MCV Mo are also significantly increased in patients on anti-TNF-α drugs compared with patients on anti-IL-6 drugs. These results indicate that MCV Ly and MCV Mo may have potential for use in RA, monitoring disease activity as well as efficacy of therapy.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Povezanost prosječnog volumena limfocita i monocita s aktivnošću bolesti kod reumatoidnog artritisa

Sara Sekelj

SAŽETAK

Reumatoidni artritis je kronična autoimuna bolest od koje boluje otprilike 1% populacije. Dijagnostika ove bolesti temelji se na brojnim metodama uključujući radiološke i laboratorijske pretrage te opću kliničku sliku. Laboratorijska dijagnostika uključuje KKS, upalne parametre (brzina SE, CRP) te imunološke pretrage na različita antitijela, npr. anti-CCP. Uz pretrage krvi, analizira se i sinovijalna tekućina. Iako ukupan broj leukocita s podatcima o udjelu pojedinih vrsta leukocita daje vrijednu informaiju o aktivnosti bolesti, tehnologija VCS pruža informaciju o svakoj pojedinačnoj stanici i stoga biokemičarima i kliničarima omogućava novi uvid u patofiziologiju upalnog procesa. U ovom radu proučene su vrijednosti prosječnog volumena limfocita i monocita u definiranju aktivnosti bolesti korištenjem VCS tehnologije automatskog analizatora na ukupno 140 uzoraka bolesnika i 32 uzorka ispitanika u kontrolnoj skupini. Analizom podataka dobivena je statistički značajna razlika između vrijednosti MCV Ly i MCV Mo kontrolne skupine ispitanika i bolesnika s dijagnosticiranim reumatoidnim artritisom te dobra korelacija s CRP-om i DAS28 kod aktivne bolesti. Također, dobivena je statistički značajna razlika u vrijednostima MCV Ly i MCV Mo u podskupinama aktivnog reumatoidnog artritisa i remisije bolesti. Uz definiranje aktivnosti bolesti dobivene su statistički značajno više vrijednosti MCV Ly i MCV Mo kod bolesnika na terapiji inhibitorima TNF-α u odnosu na bolesnike na terapiji inhibitorima IL-6. Dobiveni rezultati potvrđuju MCV Ly i MCV Mo kao potencijalne nove biljege aktivnosti bolesti i vrijedna su tema daljnjih istraživanja u ranoj dijagnostici, praćenju aktivnosti bolesti i terapije u različitim upalnim bolestima uključujući reumatoidni artritis.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 22 grafička prikaza, 13 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: reumatoidni artritis, autoimunost, upala, VCS tehnologija, prosječni volumen limfocita, prosječni volumen monocita

Mentor: **Dr. sc. Renata Zadro**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Renata Zadro,** *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Nada Vrkić, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Marija Miloš, *znanstvena suradnica Kliničkog bolničkog centra Zagreb*

Rad prihvaćen: listopad 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Connection of mean lymphocyte volume and mean monocyte volume with disease activity in rheumatoid arthritis

Sara Sekelj

SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease with a prevelance of around 1% in the world. Characterized by joint swelling, joint tenderness, and *synovial* hyperplasia, inflammatory process eventually leads to cartilage and bone *destruction*, severe disability and premature mortality. Differencial diagnosis is based on multiple diagnostic methods, including laboratory tests, radiography or other imaging techniques. Along with specific inflammatory markers such as CRP or ESR, laboratory tests include specific antibodies (anti-CCP) for RA diagnostics. Although total WBC count with cell population data gives a valuable information about disease activity, VCS technology gives information about each individual leukocyte cell population therefore giving biochemists a new insight to the pathology of inflammatory process. In this masters thesis, the VCS parameters mean lymphocyte volume (MCV Ly) and mean monocyte volume (MCV Mo) acquired from a Beckman Coulter DxH800 haematology analyzer were investigated to determine which of them could indicate the activation of inflammatory process in RA. Total number of samples was 140 in the test group and 32 in control group. Out of 140 samples, 34 were patients with active rheumatoid arthritis and 104 were in remission. The results are as follows: MCV Ly is significantly increased in patients with RA compared with control group as well as in patients with active RA compared with those in remission. MCV Mo is also significantly increased in patients with RA compared with control group as well as in patients with active RA compared with those in remission. There is a positive correlation between MCV Ly and MCV Mo and CRP and DAS28 in active rheumatoid arthritis. MCV Ly and MCV Mo are also significantly increased in patients on anti-TNF-α drugs compared with patients on anti-IL-6 drugs. These results indicate that MCV Ly and MCV Mo may have potential for use in RA, monitoring disease activity as well as efficacy of therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 22 figures, 13 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Rheumatoid arthritis, autoimmunity, inflammation, VCS technology, mean monocyte volume, mean lymphocyte volume

Mentor: **Renata Zadro, Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Renata Zadro, Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Nada Vrkić, Ph.D. *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Marija Miloš, Ph.D. *Research Associate,* Clinical Hospital Centre Zagreb

The thesis was accepted: October 2016.