

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Mihailo I. Stjepanović

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA SERUMSKOG  
VITAMINA 25(OH)D I POLIMORFIZMI GENA  
*CYP2R1, CYP27B1, DBP I VDR* KOD  
OBOLELIH OD SARKOIDOZE**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.g.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Mihailo I. Stjepanović

**SIGNIFICANCE OF SERUM VITAMIN 25(OH)D  
DETERMINATION AND *CYP2R1*, *CYP27B1*,  
*DBP* AND *VDR* POLYMORPHISMS IN  
SARCOIDOSIS PATIENTS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020.

Mentor: Prof. Dr Violeta Mihailović-Vučinić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor: Dr Sonja Pavlović, Naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. Dr Branislava Milenković, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr Vesna Škodrić-Trifunović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr Zorica Lazić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

## ZAHVALNOST

Pre svega želim da se zahvalim i izrazim veliko poštovanje mom učitelju i mentoru, svetskom ekspertu iz oblasti sarkoidoze, redovnom profesoru na Medicinskom fakultetu, Direktor Klinike za pulmologiju, KCS Profesorki Dr Violeti Mihailović-Vučinić na pomoći ukazanoj u svim fazama izrade ove disertacije, dragocenim savetima, sugestijama, moralnoj podršci i spremnosti da u svakom trenutku nesebično podeli svoje znanje.

Hvala komentoru Naučnom saradniku Dr Sonji Pavlović i njenom timu sa Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), na velikoj pomoći u realizaciji ove disertacije, a posebno Dr Vesni Spasovski.

Put od ideje do završetka doktorske disertacije ne bi bio moguć bez svestrane pomoći mojih kolega i saradnika sa Klinike za pulmologiju, a pre svega Petog kliničkog odeljenja.

## POSVETA

*Ovu disertaciju posvećujem:*

*Mojim roditeljima, supruzi Dr Mirjani Stjepanović i mojoj deci: Maji, Iliji i Eleni.*

*Vi ste moja snaga I inspiracija!*

## Rezime

### ZNAČAJ ODREĐIVANJA SERUMSKOG VITAMINA 25(OH)D I POLIMORFIZMI GENA *CYP2R1*, *CYP27B1*, *DBP* I *VDR* KOD OBOLELIH OD SARKOIDOZE

**Uvod:** Sarkoidoza je retka multisistemska granulomatozna bolest nepoznate etiologije. Karakteriše je stvaranje granuloma, koji se mogu javiti u bilo kom delu tela, a najčešće se javljaju u plućima i limfnim čvorovima. Pacijenti često pate od kašlja, nedostatka daha, bolova u grudima i izraženog umora i preti im rizik od razvoja fibroze pluća ili nepovratnog oštećenja drugih organa. Kod mnogih pacijenata bolest spontano prođe, često i bez kliničke dijagnoze, dok kod 10–30% slučajeva sarkoidoza postaje hronična i progresivna, i ponekad dovodi do smrti. Smrtnost je relativno mala, od 1-8%, zavisno od intenziteta bolesti, starosti pacijenta, pola i etničke pripadnosti.

Prema brojnim studijama, vitamin D i sarkoidoza su u bliskoj vezi. Sarkoidoza se najčešće javlja u zimskim mesecima kada je nivo vitamina D nizak. Dalje, sarkoidoza je češća u oblastima koje su dalje od ekvatora. Nedostatak vitamina D i rizik od razvoja sarkoidoze je uobičajen kod tamno pigmentiranih pojedinaca i posebno je visok kod Afro-Amerikanaca koji žive na severnim geografskim širinama i koji imaju veću učestalost nedostatka vitamina D. Kod njih je sarkoidoza ozbiljna multisistemska bolest sa hroničnim tokom.

Uloga molekularnih markera u deficijenciji vitamina D, odnosno varijanti u genima koji kodiraju za proteine uključene u metabolizam vitamina D, je nedovoljno istražena u etiologiji sarkoidoze. Smatra se da brojni proteini, među kojima su *CYP2R1*, *DBP*, *CYP27B1* i *VDR* imaju ulogu u metabolizmu i signalnim putevima vitamina D. Naime, nakon primarne aktivacije vitamina D u koži, pro- vitamin podleže dvostrukoj hidroksilaciji. Prava se odigrava u jetri posredstvom enzima *CYP2R1*, a druga u bubrezima, posredstvom *CYP27B1* enzima. Vitamin D-vezujući protein (*DBP*) je glavni nosač vitamina D, koji vezuje metabolite vitamina D i transportuje ih kroz cirkulaciju do ćelija. Receptor za vitamin D (*VDR*) pripada familiji nuklearnih receptora i nakon vezivanja liganda – aktivne forme vitamina D, stvara heterodimer sa retinoidnim X receptorom i reguliše biološku aktivnost vitamina D. *VDR* je prisutan na dendričnim ćelijama, limfocitima i markofagama – ključnim ćelijama imunofektora kod sarkoidoze. Stoga se smatra da ovi proteini, koji igraju značajnu ulogu u metabolizmu vitamina D, njegovoj konverziji u aktivan oblik, kao i signalnoj transdukciji i aktivaciji ciljnih gena mogu imati uticaj i na predispoziciju i uticati na klinički tok sarkoidoze.

**Cilj:** Cilj ove asocijativne studije bio je da se ispita nivo vitamina D kod pacijenata, kao uticaj varijanti u genima *CYP2R1* (rs10741657), *CYP27B1* (rs10877012), *DBP* (rs7041; rs4588) i *VDR* (rs2228570) na nivo serumskog vitamina D. Takođe, ispitivan je i predisponirajući uticaj ovih genetičkih varijanti na nastanak i klinički tok sarkoidoze.

**Materijal i metode:** Studija je obuhvatila 86 pacijenata sa sarkoidozom i 50 zdravih ispitanika, koji su činili kontrolnu grupu. Serumski nivo vitamina D određen je ELISA metodom, a detekcija varijanti u ispitivanim genima vršena je korišćenjem PCR-RFLP metode.

**Rezultati:** Dobijeni rezultati su pokazali da nivo vitamina D koreliše sa nivoom kalcijuma, kao i sa parametrima plućne funkcije. Takođe, rezultati su pokazali da je alel A rs4588 *DBP* gena značajno povezan sa nižim nivoima 25(OH)D vitamina D kod pacijenata sa sarkoidozom ( $p=0.046$ ). Dodatno, Za genotip AA gena *DBP* rs4588 je pokazano da je faktor rizika, jer su osobe sa ovim genotipom imale osam puta veću verovatnoću za razvoj sarkoidoze (OR 8.856,  $p=0.049$ ). Ispitanici nosioci CC genotipa u genu *CYP27B1* (rs10877012) imaju deset puta manju verovatnoću da obole od sarkoidoze (OR 0.116,  $p=0.001$ ).

**Zaključak:** Ovi rezultati pokazuju da nivo serumskog vitamina D kod pacijenata zavisi od genotipa u rs4588 *DBP* gena, i da ova genetička varijanta predstavlja faktor rizika za hipovitaminozu vitamina D. Takođe, varijante u ispitivanim genima utiču na rizik od oboljevanja od sarkoidoze, jer su genotipovi *CYP27B1* rs10877012 i *DBP* rs4588 statistički različito zastupljeni u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Ovo je značajan podatak, ne samo za sarkoidozu, već i za druge bolesti koje su posledica disfunkcije imunskog sistema. Dodatne studije, kao i drugačiji pristupi, u

kojima će se pratila ekspresija ovih gena, kao i njihova funkcionalna karakterizacija, doprineće boljem razumevanju kompleksne uloge koju vitamin D ima u zdravlju i bolesti.

**Ključne reči:** sarkoidoza, vitamin D, CYP27B1, VDR, DBP, CYP2R1

**Naučna oblast:** MEDICINA

**Uža naučna oblast:** PULMOLOGIJA

## Summary

### **SIGNIFICANCE OF SERUM VITAMIN 25(OH)D DETERMINATION AND CYP2R1, CYP27B1, DBP AND VDR POLYMORPHISMS IN SARCOIDOSIS PATIENTS**

**Introduction:** Sarcoidosis is a rare multisystem granulomatous disease of unknown etiology. It is characterized by the formation of granulomas, which can occur in any part of the body, most commonly occurring in the lungs and lymph nodes. Patients often suffer from coughing, shortness of breath, chest pain, and severe fatigue and are at risk of developing lung fibrosis or irreversible damage to other organs. In many patients, the disease resolves spontaneously, often without clinical diagnosis, while in 10-30% of cases, sarcoidosis becomes chronic and progressive, sometimes leading to death. Mortality is relatively low, from 1-8%, depending on the intensity of the disease, the patient's age, gender and ethnicity.

According to numerous studies, vitamin D and sarcoidosis are in close relationship. Sarcoidosis most commonly occurs in the winter months when vitamin D levels are low. Further, sarcoidosis is more common in areas beyond the equator. Vitamin D deficiency and the risk of sarcoidosis are common in dark pigmented individuals and are particularly high in African Americans living in northern latitudes and with a higher incidence of vitamin D. For those individuals sarcoidosis is a serious multisystemic disease with a chronic course.

The role of molecular markers in vitamin D deficiency, that is, variants in genes encoding for proteins involved in vitamin D metabolism, has not been sufficiently investigated in the etiology of sarcoidosis. A number of proteins, including CYP2R1, DBP, CYP27B1, and VDR, are thought to play a role in the metabolism and signaling pathways of vitamin D. Namely, after primary activation of vitamin D in the skin, pro-vitamin D undergoes double hydroxylation. The first one is taking place in the liver by the CYP2R1 enzyme and the other one is in the kidney by the CYP27B1 enzyme. Vitamin D-binding protein (DBP) is a major carrier of vitamin D, which binds all vitamin D metabolites and transports them through the circulation to the cells. The vitamin D receptor (VDR) belongs to the nuclear receptor family and, after ligand binding, the active form of vitamin D creates a heterodimer with the retinoid X receptor and regulates the biological activity of vitamin D. VDR is present on dendritic cells, lymphocytes and macrophages – key immune effector cells involved in sarcoidosis. Therefore, it is thought that these proteins, which play a significant role in the metabolism of vitamin D, its conversion to the active form, as well as signal transduction and activation of target genes, may also act as susceptibility factors and also influence the clinical course of sarcoidosis.

**Aim:** The aim of this associative study was to examine the level of vitamin D in sarcoidosis patients and the influence of variants in genes CYP2R1 (rs10741657), CYP27B1 (rs10877012), DBP (rs7041; rs4588) and VDR (rs2228570) on serum vitamin D. Additionally, the predisposing influence of these genetic variants on the onset and clinical course of sarcoidosis was examined.

**Material and methods:** The study included 86 patients with sarcoidosis and 50 healthy subjects, who comprised the control group. Serum vitamin D levels were determined by the ELISA method, and detection of variants in the genes tested was performed using the PCR-RFLP method.

**Results:** Our results showed that vitamin D levels correlated with calcium levels as well as with pulmonary function parameters. Also, the results showed that the allele A of the rs4588 of DBP gene was significantly associated with lower levels of 25(OH)D vitamin D in patients with sarcoidosis ( $p=0.046$ ). Additionally, the AA genotype of DBP rs4588 gene was shown to be a risk factor, as individuals with this genotype were eight times more likely to develop sarcoidosis (OR 8.856,  $p=0.049$ ). Subjects carrying the CC genotype in the CYP27B1 gene (rs10877012) were ten times less likely to develop sarcoidosis (OR 0.116,  $p=0.001$ ).

**Conclusion:** These results show that the level of serum vitamin D in patients depends on the genotype of the rs4588 DBP gene, and that this genetic variant represents a risk factor for vitamin D hypovitaminosis. Also, variants in the tested genes influence the risk of sarcoidosis, because the genotypes in rs10877012 CYP27B1 and rs4588 DBP were statistically different in the patient group compared to the control group. This is a significant result, not only for sarcoidosis, but also for other



diseases resulting from immune system dysfunction. Additional studies, as well as different approaches, which will monitor the expression of these genes, as well as their functional characterization, will contribute to a better understanding of the complex role that vitamin D plays in health and disease.

**Keywords:** sarcoidosis, vitamin D, *CYP27B1*, *VDR*, *DBP*, *CYP2R1*

**Scientific field:** medicine

**Narrower scientific field:** Pulmology

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Sarkoidoza .....	1
1.1.1. Sarkoidoza-otkriće bolesti .....	1
1.1.2. Epidemiologija i etiologija sarkoidoze .....	1
1.1.3. Patogeneza sarkoidoze .....	2
1.1.4. Granulomi kao glavno obeležje sarkoidoze .....	2
1.1.5. Genetički faktori uzročnici sarkoidoze .....	3
1.1.6. Kliničke manifestacije .....	3
1.1.7. Ekstrapulmonalna sarkoidoza .....	5
1.1.8. Klasifikacija sarkoidoze .....	5
1.1.9. Dijagnostika sarkoidoze .....	5
1.1.10. Biomarkeri u dijagnostici sarkoidoze .....	9
1.1.11. Vitamin D .....	10
• Enzimi uključeni u hidroksilaciju .....	13
• 25-hidroksivitamin D-1 $\alpha$ hidroksilaza (CYP27B1) .....	13
• Vitamin D 25-hidroksilaza (CYP2R1) .....	13
• Vitamin D-vezujući protein (DBP) .....	13
• Vitamin D receptor (VDR) .....	13
1.1.12. Terapija sarkoidoze .....	14
2. Cilj .....	16
3. MATERIJAL I METODE .....	17
3.1. Ispitanici .....	17
3.1.1. Uzorkovanje krvi .....	17
3.1.2. Analiza serumskog 25(OH)D .....	17
3.1.3. Detekcija genetičkih varijanti .....	17
3.1.4. Izolacija DNK .....	18
3.1.5. Statistička obrada .....	18
4. REZULTATI .....	19
4.1 Deskripcija pacijenata sa sarkoidozom .....	19
4.1.1. Vitamin D i osnovne kliničke karakteristike bolesnika .....	22
4.1.2. Analiza genotipa u grupi pacijenata sa sarkoidozom .....	29
5. DISKUSIJA .....	37
6. ZAKLJUČCI .....	40
7. LITERATURA .....	41

# 1. UVOD

## 1.1. Sarkoidoza

### 1.1.1. Sarkoidoza-otkriće bolesti

Sarkoidoza je granulomatozno oboljenje i nepoznate etiologije i nepredvidivog toka. Prvi put bolest je opisana krajem XIX veka, kada je dr Jonathan Hutchinson u Londonu po prvi put opisao slučaj bolesnika sa sarkoidozom, sa svojim karakterističnim izgledom lezija kože po tipu lupus pernia, tipičnim znakom hronične forme ove bolesti. Međutim on nije učinio i biopsiju kožnih promena. To je nešto kasnije učinio dr Caesar Boeck, prvi lekar koji je opisao histopatološki nalaz tj. sarkoidni granulom. Napredak medicine unapredio je saznanja o patogenezi i dijagnostici sarkoidoze, kao i njenu terapiju i omogućio bolji diferencijalno-dijagnostički pristup ovoj bolesti [1, 2]. Danas važeća definicija sarkoidoze ustanovljena je 1969. godine kada je na Drugoj internacinalnoj konferenciji o sarkoidozi u Vašingtonu usvojen tzv. deskriptivni paragraf o sarkoidozi koji se ni do današnjih dana nije izmenio. On glasi:

„Sarkoidoza je sistemska granulomatozna bolest neodređene etiologije i patogeneze. Najčešće su zahvaćeni medijastinalni i periferni limfni čvorovi, pluća, jetra, slezina, koža, oči, falangealne kosti i parotidne žlezde, ali i drugi organi ili tkiva mogu biti napadnuti. Kveimova reakcija je često pozitivna, a hipersenzibilnost tuberkulinskog tipa snižena. Drugi važni laboratorijski nalazi su hiperkalciurija i povišeni serumski globulini. Karakterističan histološki izgled epitelioidnih tuberkula, sa malo ili bez nekroze nije patognomoničan pa se mora isključiti tuberkuloza, gljivične infekcije, berilioza i lokalne sarkoidne reakcija. Treba smatrati da je dijagnoza postavljena u kliničke svrhe u pacijenata koji imaju odgovarajuću kliničku sliku zajedno sa bioptičkim dokazom epitelioidnih tuberkula ili pozitivnim Kveimovim testom“ [3, 4].

Iako sarkoidoza predstavlja sistemska oboljenje, najčešće zahvaćeni organi su pluća i intratorakalne limfne žlezde (kod 90% pacijenata) [5-12]. Pacijenti često pate od kašlja, nedostatka daha, bolova u grudima i izraženog umora i preti im rizik od razvoja fibroze pluća ili nepovratnog oštećenja drugih organa [13]. Kod mnogih pacijenata bolest spontano prođe, često i bez kliničke dijagnoze, dok kod 10-30% slučajeva sarkoidoza postaje hronična i progresivna, i ponekad dovodi do smrti [14]. Smrtnost je relativno mala, od 1-8%, zavisno od intenziteta bolesti, starosti pacijenta, pola i etničke pripadnosti [15].

### 1.1.2. Epidemiologija i etiologija sarkoidoze

Sarkoidoza je sve prisutnija bolest u svetu. Podaci o učestalosti sarkoidoze govore da je ona druga najprisutnija bolest respiratornog sistema posle astme kod populacije 20-40 godina [16]. Podaci o učestalosti sarkoidoze često nisu dostupni u mnogim sredinama, pre svega zbog varijabilnosti njenog ispoljavanja. Kako se kod oko 80% pacijenata ona nalazi u svom subkliničkom toku, ovo oboljenje često nije zapaženo i registrovano od strane doktora. U mnogim zemljama, pa i razvijenijim, pouzdani podaci nisu adekvatno sakupljeni, upravo stoga što mnoge asimptomatske forme nisu nikad ni mogle biti registrovane, takođe ni one forme kod kojih je došlo do spontane remisije oboljenja. Međutim, dobro je poznato da je njena rasprostranjenost veća kod pojedinih rasa i etničkih zajednica, kao što su stanovnici Severne Evrope i Amerike, naročito zapadno-afričkog porekla. Naime, u Americi crna rasa više oboljeva i ima 12 puta veću stopu smrtnosti od belaca istog podneblja [17]. Tipično, sarkoidoza se javlja tokom treće i četvrte decenije života. U Skandinavskim zemljama i Japanu postoji veća prevalenca obolevanja kod žena starijih od 50 godina [16]. Ukupna učestalost bolesti u SAD se procenjuje od 40 obolelih na 100 000 stanovnika, sa godišnjom incidencom 35.5 prema 100 000 među Amerikancima afričkog porekla i 10.9 prema 100 000 stanovnika kod Amerikanaca bele rase [18]. Incidenca u Srbiji (populacija ~7 miliona) je 16-20 na 100,000 stanovnika [19], i slična je kao u zemljama slične geografske širine i boje kože [20].

### 1.1.3. Patogeneza sarkoidoze

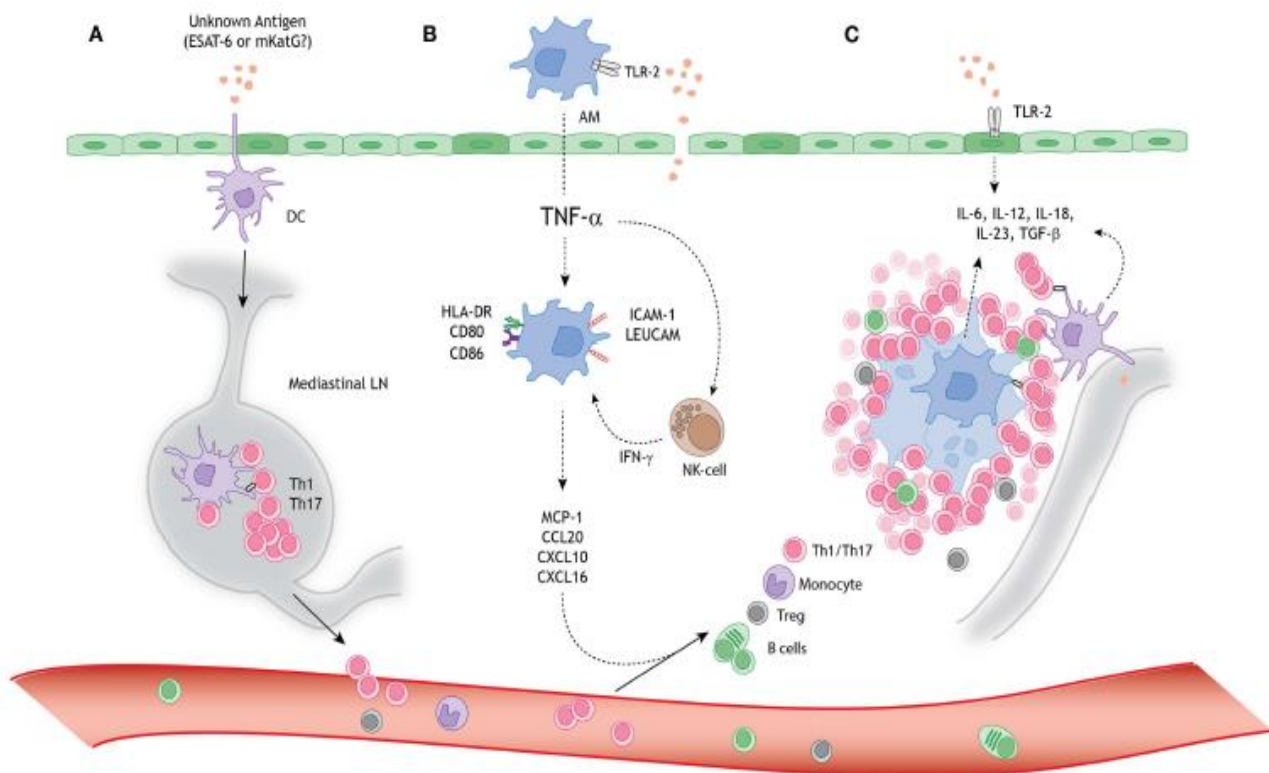
Uzrok sarkoidoze nije poznat, ali istraživanja sugerišu da bi infektivni uzročnici, hemikalije, prašina kao i preterane reakcije imunskog sistema na vlastite proteine u telu mogli biti odgovorni za stvaranje granuloma kod ljudi koji su genetski predisponirani.

Uticaj životne sredine, odnosno okruženja na razvoj sarkoidoze može se podeliti u neinfektivne i infektivne agense. U infektivne agense spadaju *Mycobacterium tuberculosis* i *Propionibacterium acnes* [16]. Izloženost neinfektivnim agensima, poput pesticida, insekticida, polena, silicijuma ili talka, metalne prašine i mineralnih vlakna, mogu se smatrati potencijalnim okidačima [16]. Radna mesta na kojima su radnici izloženi ovim faktorima, kao što su obrada metala i vatrogasna služba [21], pomorska služba [22] mogu se povezati sa pojavom sarkoidoze. Studija koja je pratila zdravstveno stanje njujorških vatrogasaca posle rada na raščišćavanju ruševina nakon bombardovanja Svetskog trgovinskog centra 2009 u SAD-u je pokazala porast broja obolelih od sarkoidoze [23]. Opisana je zastupljenost sarkoidoze kod bolesnika koji se greju na drva i onih koji su izloženi fotokopir tonerima (koji sadrže metalni prah) [24].

### 1.1.4. Granulomi kao glavno obeležje sarkoidoze

Patohistološki marker sarkoidoze je nekazeifikovani granulom, koji se sastoji od skupa centralno grupisanih makrofaga i epiteloidnih ćelija okruženih limfocitima. Formiranje granuloma nastaje usled kompleksne interakcije između nepoznatog antigena i intersticijalnih dendritskih ćelija, makrofaga i alveolarnih epitelijalnih ćelija tipa 2 (Slika 1). Dendritske ćelije stupaju u interakciju i prezentuju nepoznati sarkoidni antigen naivnim T limfocitima, koji se diferenciraju i klonalno umnožavaju. Alveolarni makrofazi doprinose ranom prepoznavanju sarkoidnog antigena u plućima i učestvuju u privlačenju monocita i aktiviranih T limfocita. Aktivirani makrofazi luče NF- $\kappa$ B-zavisne medijatori zapaljenja poput interleukina 1 (IL-1), interferon- $\gamma$  i faktora nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ). Na mišijem modelu koji je koristio *Mycobacterium tuberculosis*, TNF- $\alpha$  se pokazao kao odgovoran za ranu produkciju hemokina, kao što MIP-1a, MIP-1b, MIP-2, MCP-1 i RANTES, koji privlače mononuklearne ćelije na mesto inflamacije i dovode do formiranja granuloma sa znacima granulomatozne inflamacije i tipičnim histološkim karakteristikama [25]. Perzistentna stimulacija antigenom, posredovana antigen-prezentujućim ćelijama, dovodi do regrutovanja Th1 i Th17 limfocita i tipičnom ekspresijom proinflamatornih citokina, kao što su TGF- $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 i IL-23 [25].

Sa razvojem bolesti granulomi mogu doživeti dvojaku sudbinu: ili bivaju razloženi i resorbovani, čime se bolest povlači, ili podležu fibrozi, što dovodi do trajnog oštećenja pluća. Prema dosadašnjim saznanjima limfociti tipa 2 (Th2) posreduju u ovoj reakciji [26].



**Slika 1.** Šematski prikaz formiranja granuloma kod pulmonarne sarkoidoze (preuzeto iz Broos *et al.* 2013) [27]

### 1.1.5. Genetički faktori uzročnici sarkoidoze

Iako je uzrok sarkoidoze nepoznat, postoje dokazi da sarkoidoza nastaje kod genetički podložnih domaćina sa povišenim Th1 imunskim odgovorom u neadkvatnom odgovoru na specifične faktore iz okruženja [16]. Uloga genetičkog faktora u nastanku sarkoidoze je potkrepljena podacima da postoji grupisanje slučajeva u porodicama [28], povećana učestalost kod monozigotnih blizanaca [29] kao i povećana podložnost kod različitih etničkih grupa [5].

Istraživanja su pokazala da su za predisponirajući faktori za sarkoidozu geni koji kodiraju proteine uključene u imunski odgovor. GWAS studije i asocijativne studije ukazale su na region 6p21.3, koji sadrži gene koji kodiraju proteine uključene u antigen prezentaciju i aktivaciju T ćelija, među kojima su human leukocyte antigen (HLA) i *butyrophilin-like* protein (BTNL)-2 [30-33]. Specifični HLA antigeni klase II su asocirani sa akutnom sarkoidozom, Löfflerov-im sindromom i lakšom formom bolesti (HLA-DRB1\*03 i DQB1\*0201 aleli), dok su aleli HLA-DRB1\*15 i DQB1\*0601 asocirani sa hroničnom sarkoidozom [34-37].

### 1.1.6. Kliničke manifestacije

Sarkoidoza je multiorganska bolest, a njene kliničke manifestacije zavise od lokalizacije, proširenosti procesa, njegovog trajanja i aktivnosti. Kod dve trećine pacijenata, sarkoidoza ima asimptomatsku formu i otkriva se slučajno radiološkim pregledom.

U sarkoidozu razlikuju se tri klinička oblika bolesti: akutni, subakutni i hronični.

Akutni tok bolesti karakteriše pojava artralgija, febrilnosti i nodoznog eritema. Udružena pojava ovih simptoma sa bilateralnom hilarnom adenopatijom čini Löfflerov sindrom. On obično predstavlja znak

dobre prognoze i tendencije ka spontanoj remisiji, koja se javlja kod dve trećine bolesnika. Učestalost ovog sindroma naročito je velika u skandinavskim zemljama [3, 37].

Subakutni tok bolesti predstavljen je simptomima koji traju manje od dve godine, ali bez izražene tendencije ka spontanoj remisiji. Perzistentne tegobe, koje prate ovaj oblik bolesti, slabije reaguju na primenjenu terapiju.

Hronični tok bolesti podrazumeva perzistiranje tegoba duže od dve godine. Tih i progresivan tok je odlika ovog oblika. Može u kasnijim stadijumima dovesti i do hronične respiratorne insuficijencije. Često je praćen kožnim lezijama i očnim poremećajima, ali i ostalim vanplućnim manifestacijama. Nepredvidivost hroničnog toka bolesti i parametri koji bi mogli što pouzdanije da predvide dalji tok bolesti i dalje su predmet novijih istraživanja. U našoj populaciji bolesnika sa plućnom i vanplućnom sarkoidozom, prisutan je dosta visoki procenat hronične forme bolesti, oko 30%. Naročito nepovoljan hronični tok može se očekivati kod bolesnika sa ekstrapulmonalnom formom bolesti i to prilikom zahvaćenosti miokarda, centralnog nervnog sistema, jetre i kostiju. Ovakva ekstrapulmonalna lokalizacije sarkoidoze prisutna na početku bolesti, kao i njen atipični početak, znaci su loše prognoze i hroničnog toka bolesti. Hroničan tok sarkoidoze, tj. ponavljanje tzv. recidivi mogu se javiti i godinama a nekad i decenijama nakon što je prvobitno lečenje završeno [38, 39].

Najčešći simptomi i znaci sarkoidoze:

Kod pacijenata koji imaju simptome *kašalj i dispneja* se su najčešći simptomi, prisutni kod oko 90% bolesnika sa akutnom formom sarkoidoze [3].

*Zvižduci („wheezing“)* su auskultatorni znaci koji mogu da dovedu do pogrešne dijagnoze i da liče na opstruktivne bolesti pluća. Nasuprot uvreženom mišljenju da je sarkoidoza bolest u kojoj u funkcionalnom smislu je prisutna restrikcija a ne opstrukcija protoku vazduha, prvi znaci sarkoidoze mogu biti opstruktivske tegobe. Zapaljenje može zahvatiti sve disajne puteve, što je, zajedno s edemom sluznice, uzrok visokotonskih zvižduka [1].

*Bronhijalna hiperreaktivnost*, prisutna je kod 20% obolelih, je u vezi s oštećenjem epitela bronha i otkrivanjem površnih aferentnih nervnih završetaka [3].

*Bol u grudima* je pleuralnog tipa, substernalne ili infraskapularne lokalizacije, povezan je s kašljem i najverovatnije je mišićnog porekla. Bol nije u korelaciji s mestom granulomatoznih plućnih lezija, niti sa masivnošću medijastinalne limfadenopatije. Dispneja, kašalj i bol u grudima viđaju se u oko 20% do 50% obolelih [1, 3].

*Atralgije* zahvataju uglavnom krupnije zglobove. Mogu se javiti i koštane ciste koje su uglavnom bezbolne.

Mnogi sarkoidni bolesnici imaju kožne manifestacije. U oko 25 % slučajeva je prisutan *nodozni eritem*. *Lofgen-ov sindrom* čini sledeći trijas: nodozni eritem, bilateralna hilarna limfadenopatija i artralgije. Njegov nalaz je karakterističan za akutnu sarkoidozu i češći je kod belaca.

*Heerfordt-ov sindrom* je kombinacija bilateralnog uvećanja parotidnih žlezda, uveitisa uz zahvatanje facijalnog nerva.

*Lupus pernio* je tipična kožna lezija koja se viđa kod hronične sarkoidoze i često se povezuje s koštanim lezijama.

Učestalost *očnih simptoma* je različita, javljaju se u manje od 20% slučajeva. Simptomi i znaci variraju u zavisnosti od segmenta oka u kome su locirani granulomi, a najčešći su zamućenje ili pad vida, fotofobija, crvenilo i gubitak vidne oštine [40].

*Nespecifični simptomi* i znaci javljaju se s različitom učestalošću u sarkoidozi, najčešće su to malaksalost, odnosno osećaj zamora, poliurija, žeđ, mono ili polineuritsi, anemija i slabost mišića. *Zamor* je značajan simptom koji prati veliki broj autoimunih, malignih i infektivnih oboljenja. Zamor je takođe značajan simptom kod obolelih od sarkoidoze. Zamor je zabeležen kod 50-70% bolesnika sa sarkoidozom, što dovodi do narušenog kvaliteta života ovih bolesnika. Etiologija ovog problema je obično multifaktorijalna. Zamor može biti posledica samog tretmana, uključujući i komplikaciju kortikosteroidne terapije. Formiranje granuloma i oslobađanje citokina mogu biti uključeni u njegovu etiologiju. Bolesnici opisuju svoj osećaj zamora kvalitativno različito u odnosu na zamor koji su imali pre nego što su postali bolesni. Određivanje stepena izraženosti zamora u sarkoidozi pruža značajan uvid u procenu pogoršanja kvaliteta života bolesnika [1, 3, 38].

### 1.1.7. Ekstrapulmonalna sarkoidoza

Sarkoidoza je imunološki posredovano oboljenje koje može zahvatiti bilo koji organ i da se prezentuje u različitim formama, shodno zahvaćenom organu. Prisustvo vanplućnih manifestacija sarkoidoze može da utiče na prognozu kao i na terapijski izbor. Ekstrapulmonalna sarkoidoza je prisutna u 25-50% slučajeva obično u kombinaciji sa plućnom sarkoidozom. I pored zahvaćenosti različitih organskih sistema, ponekad se bolest ispoljava i bez prisustva simptoma. Najčešće drugi zahvaćeni organi su: koža u oko 30% slučajeva, oko u 25%, jetra i slezina u 20% a srce i nervni sistem u po 5% slučajeva [41-44].

### 1.1.8. Klasifikacija sarkoidoze

Postoje nekoliko klasifikacija sarkoidoze.

Prema zahvaćenosti organa:

- Torakalna (ili plućna)
- Ekstra- torakalna forma (ili vanplućna)

Pošto sarkoidoza u najvećem broju slučajeva zahvata pluća preko 90%, tako i pulmolozi se i bave dijagnostikom i lečenjem ove bolesti. Međutim, upravo zbog njene vanplućne forme nekada je potreban i ceo tim doktora različitih specijalnosti da se došlo po dijagnoze a potom i izlečenja. Pored pluća i limfnih zlezda najčešće su zahvaćeni koža, oči, centralni nervni sistem, jetra, slezina, kosti, mišići, bubrezi.

**Prema simptomima:**

- asimptomatska,
- simptomatska-akutna,
- subakutna ili hronična forma

Većina bolesnika doživi spontanu remisiju tokom nekoliko meseci od početka bolesti.

Akutni početak bolesti počinje sa povišenom telesnom temperaturom, atralgijom i pojavom nodoznog eritema. Udruženost ovih simptoma sa opisanom bilateralnom hilarnom limfadenopatijom na radiografiji grudnog koša čini Lofgrenov sindrom. On obično predstavlja znak dobre prognoze bolesti i tendenciju ka spontanoj remisiji, koja se javlja kod približno dve trećine bolesnika. Kod akutne forme bolesti simptomi i znaci bolesti se povuku spontano ili sa terapijom unutar dve godine.

Subakutna forma bolesti predstavljena je simptomima u trajanju do dve godine, ali bez izražene tendencije ka spontanoj remisiji. Prisutne tegobe koje prate ovu formu bolesti, teže se leče imunosupresivnom terapijom. Naročito je čest u Indiji.

Hronična forma bolesti podrazumeva formu I tok bolesti sa prisutnim tegobama koje traju duže od dve godine. Ovaj oblik karakteriše tih I progresivan tok. Može da dovede I do hronične respiratorne insuficijencije. Često je praćen kožnim I očnim lezijama. Učestali forme ove bolesti je prisutna u tropskim zemljama, crnoj populaciji I Indiji.

**Prema radiološkom snimku pluća:**

- Progredirajuća
- Regredirajuća [3, 45].

### 1.1.9. Dijagnostika sarkoidoze

Sa dijagnostičkog aspekta, neophodno je bolest potvrditi kako klinički tako i patohistološki.

Ne postoji jedinstven dijagnostički test za sarkoidozu. Dijagnoza zahteva prisustvo sledeća tri koraka:

1. Prepoznati tipičnu kliničku sliku sarkoidoze
2. Prepoznati promene na radiografiji grudnog koša
3. Obezbedit histološki nalaz u smislu nekazeifikovanog granuloma u dobivenom bioptičkom uzorku [42, 44]. Definitivna dijagnoza sarkoidoze (ukoliko je to moguće), a da pri tome primenjeni

invazivni dijagnostički postupci tipa bronhološkog ispitivanja sa biopsijom ne ugroze bitno bolesnika, jeste bronhoskopija sa biopsijom kao i otvorena biopsija pluća.

Put do dijagnoze nekad je poprilično dug, i prođe i po nekoliko meseci do postavljanja definitivne dijagnoze sarkoidoze. U proseku pacijenti imaju prve simptome bolesti 3 meseca ili duže pre dijagnoze i u proseku posete 3 ili više lekara različitih specijalnosti pre postavljanja dijagnoze [46].

### 1.1.9.1. Radiološka dijagnostika sarkoidoze

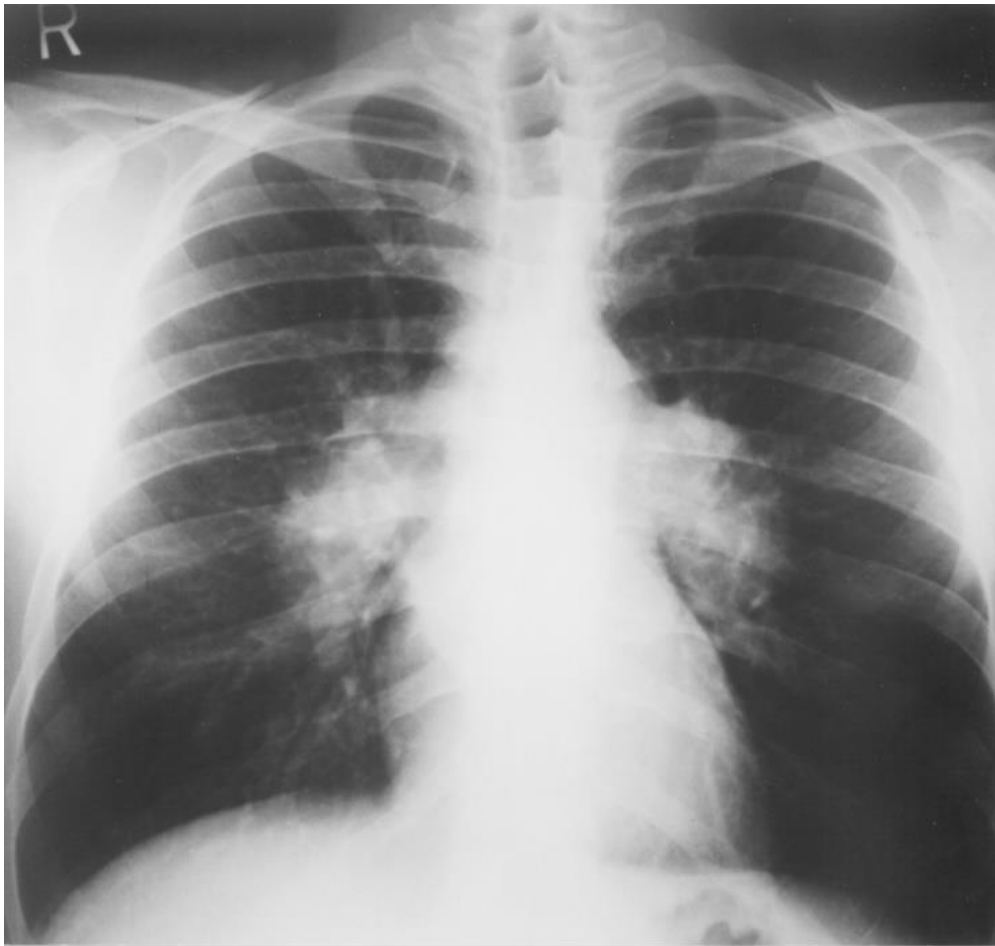
Radiografija grudnog koša pokazuje patološke promene kod preko 90% obolelih od sarkoidoze. Upravo zato ona se i smatra kao standardnom inicijalnom dijagnostičkom metodom, i svi bolesnici pod sumnjom na sarkoidozu je moraju i učiniti. U oko 50-85% obolelih uočava se bilateralna hilarna adenopatija, a promene po parenhimu su prisutne u 25 do 60% obolelih. I dalje se u praksi koristi radiografska podela na pet stadijuma (0-IV), jer ima umerenu korelaciju sa prognozom bolesti [43, 44].

**Tabela 1.** Radiografski stadijumi sarkoidoze

<b>Radiografski stadijum</b>	<b>Radiografski nalaz</b>
Stadijum 0	Normalna PA radiografija
Stadijum I (60-90%)	Bilateralna hilarna adenopatija (BHL)
Stadijum II (40-70%)	BHL + parenhimske promene
Stadijum III (10-20%)	Parenhimski infiltrati bez BHL
Stadijum IV (0%)	Ireverzibilne fibrozne promene

Pokazano je da oni koji imaju radiografski verifikovane više stadijume imaju i izraženiju simptomatologiju, veće oštećenje plućne funkcije, manji procenat spontane remisije i viši mortalitet. Pošto je radiografska regresija moguća u svim stadijumima bolesti, osim u IV stadijumu, sama radiografija nije dovoljno pouzdana za predviđanje prognoze bolesti (Slika 2). Do spontane rezolucije u I stadijumu dolazi kod 55% do 90% slučajeva, a 40 do 70% u II stadijumu i samo u 10 do 20% kod bolesnika sa III stadijumom, fibroza pluća tj. IV stadijum čak kad se i intenzivno leči nije reverzibilan proces [44, 47].





**Slika 2.** Stadijum I na radiografiji grudnog koša

Mnogo specifičnija i senzitivnija radiološka metoda u dijagnostici sarkoidoze je **kompjuterizovana tomografija** grudnog koša visoke rezolucije („*High resolution computed tomography*“, HRCT) . HRCT je superioran u razlikovanju granulomatozne inflamacije od drugih difuznih bolesti plućnog parenhima, uključujući i fibrozu. Karakteristike nalaza HRCT obuhvataju: medijastinalnu i /ili hilarnu adenopatiju, mikronodularne promene duž bronhovaskularnih struktura i pleuralno ili subpleuralno lokalizovane nodule [42, 44].

Primena fluoro-2-deoksi-D-glukoza pozitronska emisiona tomografija/kompjuterizovana tomografija tj. **18F-FDG PET/CT** do sada je našla svoje značajno mesto kod malignih bolesti, ali primena ove metode može biti opravdana i kod drugih oboljenja kao što su granulomatozna oboljenja tipa sarkoidoze. Opravdanost primene ove metode, utvrđena je na osnovu značajnih rezultata koja se mogu klasifikovati u dijagnosticka polja, polja praćenja aktivnosti sarkoidoze pa time i praćenje terapijskih ishoda (Slika 3) [48].



**Slika 3.** Bilateralna hilarna limfadenopatija na 18F-FDG PET/Ct-u

#### **1.1.9.2. Bronhoskopija-invazivna dijagnostika sarkoidoze**

U većini slučajeva, u dijagnostici sarkoidoze neophodna je biopsija dostupnih lezija i histološka verifikacija, što čini fleksibilnu bronhoskopiju metodom izbora u invazivnoj dijagnostici sarkoidoze pluća. Pre svega zahvaljujući konstrukciji bronhoskopa i instrumentarijuma, moguće je uzimanje biopsija visokog kvaliteta sa različitih anatomskih lokacija. Transbronhijalna biopsija pluća forcepsom je standard u dijagnostici sarkoidoze i primenjuje se uvek u toku bronhoskopije. Senzitivnost i specifičnost ove metode rastu sa stadijumom bolesti (češće se dokazuje u II i III (70%) nego u prvom stadijumu (50%)). Biopsija endobronhijalnih lezija kod sarkoidoze u više od 70% slučajeva potvrđuje dijagnozu, a kod bolesnika sa patološkim endoskopskim nalazom, verovatnoća postavljanja dijagnoze je 76–86% ukoliko se kombinuje sa transbronhijalnom biopsijom. Biopsiju sluznice bronha opravdano je raditi čak i kada je endoskopski nalaz uredan. Endoskopski nalaz može predstavljati odraz patogeneze sarkoidoze. Transbronhijalna iglena aspiraciona biopsija je takođe standard u dijagnostici sarkoidoze, posebno u I i II stadijumu bolesti. Značajno veća pozitivnost nalaza postiže se kada je ova biopsija vođena endobronhijalnim ultrazvukom. Značaj bronhoalveolarne lavaže u dijagnostici sarkoidoze je i dalje predmet ispitivanja; prema sadašnjim standardima prihvaćena je kao dopunska metoda [49, 50].

### 1.1.10. Biomarkeri u dijagnostici sarkoidoze

Biohemijski markeri za procenu aktivnosti sarkoidoze su predmet i dalje brojnih istraživanja. Naročito se ispituje mogućnost objektivnog sagledavanja bolesti i procene aktivnosti granuloma. Značenje pojedinih biohemijskih parametara je različito. Neki se odnose isključivo na inflamatornu komponentu i postojanje samih granulomskih formacija, dok pak drugi mnogo određenije i specifičnije su povezani sa aktivnošću samih ćelija iz sastava granuloma. Sam inflamatorni proces kao i formiranje granuloma u samim plućima ili nekom drugom zahvaćenom organu ima za posledicu različite enzimske aktivnosti, koju možemo objektizovati postojećim biohemijskim markerima. Za analizu enzimske aktivnosti mogu poslužiti krv ili bilo koja druga telesna tečnost povezana sa mogućom aktivnom sarkoidozom (likvor, suze, BAL).

#### 1.1.10.1. Angiotenzin-konvertujući enzim (ACE)

Najčešće korišćeni serumski biomarker u sarkoidozi je angiotenzin-konvertujući enzim (*ACE*), njegovo određivanje je široko raspostranjena metoda kod ovih bolesnika i to ne samo iz krvi već i u drugi telesnih tečnosti. Njegovo određivanje je značajno i u dijagnostici sarkoidoze kao i u praćenju samog toka bolesti. U sarkoidozi ACE je prisutan u markofagima samog granuloma, kao i na površini epiteloidnih ćelija i odražava prisustvo i ekstenzivnost samog granuloma. Obzirom da je njegova senzitivnost i specifičnost ograničena, naime aktivnost serumskog ACE je povišena kod svega 60% bolesnika sa hroničnom sarkoidozom, pojavili su se i noviji biomarkeri.

#### 1.1.10.2. Hitotriozidaza

Hitotriozidazu kao biomarker za sarkoidozu prvi put uvodi Grosso i saradnici 2004. godine [51], koji su pokazali da je vrednost hitotriozidaze viša kod bolesnika sa sarkoidozom u odnosu na kontrolnu grupu. Ovom studijom kojom je obuhvaćeno 43 ispitanika kod kojih je potvrđena sarkoidoza i 32 ispitanika koji su bili deo kontrolne grupe viđeno je i da su vrednosti hitotriozidaze više kod aktivne forme bolesti u odnosu na neaktivnu formu, kao i da postoji i korelacija između ovog enzima i radiološkog stadijuma bolesti, što ukazuje na to da se hitotriozidaza može koristiti kako u prognostičke tako i u dijagnostičke svrhe. Ideja za upotrebu ovog markera u sarkoidozi je potekla iz toga da aktivirani makrofagi učestvuju u patogenezi ove bolesti kao i u formiranju granuloma. Bolesnici sa sarkoidozom imaju povišen nivo hitotriozidaze kao rezultat masovne proizvodnje hitotriozidaze iz sarkoidnih makrofaga. Na osnovu dosadašnjih publikovanih studija može se zaključiti da je hitotriozidaza dobar biomarker u sarkoidozi sa dobrom kao senzitivnošću tako i specifičnošću. Može se koristiti u kliničkoj praksi za praćenje bolesnika sa progresivnom bolešću, za otkrivanje recidiva i praćenje efekta terapije.

#### 1.1.10.3. Hiperkacemije i/ili hiperkalciurije kod sarkoidoze

Kod pacijenata sa sarkoidozom i hiperkalcemijom, prekomerni nivoi 1,25-dihidroksivitamina D dovode do povećane apsorpcije kalcijuma i/ili koštane resorpcije u crevima. Međutim, važno je prepoznati dodatne uzroke hiperkalcemije, uključujući primarni hiperparatiroidizam i malignitet, koji čine 62 do 81% hiperkalcemičnih stanja u ambulantnim i bolničkim uslovima. Intaktni PTH ili PTH-povezani peptidni testovi (PTHrP) pomažu u razlikovanju primarnog hiperparatiroidizma od alternativnih etiologija kao što su malignost ili granulomatozna bolest (sarkoidoza, gljivične infekcije, mikobakterijske infekcije) [52]. Imajući u vidu široke varijacije u izveštavanju o hiperkalcemiji i/ili hiperkalciuriji među različitim populacijama pacijenata je i te kako veliki klinički izazov. Zapažanja su da hiperkalcemija može biti vrlo česta u značajnoj manjini pacijenata. Kod nekih osoba sa sarkoidozom, hiperkalcemija može biti jedina indikacija za terapiju steroidima. Adekvatna hidratacija i kortikosteroidna terapija obično ispravljaju akutnu jaku hiperkalcemiju. Međutim, mnogi pacijenti sa hroničnom bolesti bubrega zahtevaju češće praćenje nivoa kalcijuma u serumu i

kreatinina [53]. Ishrana bogata vitaminom D, se sve više uključuje u medicinsku negu odraslih. Odluka da se dopuni nedostatak vitamina D kod pacijenata, kao primarna strategija prevencije, treba da se zasniva na uočenim potrebama i rizicima suplementacije. Uprkos opservacionim asocijacijama hipovitaminoze D sa autoimunim bolestima, raku debelog creva, raku dojke, kardiovaskularnim bolestima ili mortalitetu od svih uzroka, nijedna randomizirana, kontrolisana interventna studija dodatka vitamina D nije pokazala potrebu smanjenja primarne prevencije ovih bolesti kod odraslih. Međutim, čini se da većina pacijenata sa sarkoidozom toleriše vitamin D od 200 do 400 IU dnevno bez ispoljavanja hiperkalciurije i/ili hiperkalcemije [19, 54]. Vitamin D se tradicionalno preporučuje uz dodatak kalcijuma kao primarnu strategiju prevencije kako bi se smanjio rizik od osteoporotskih fraktura. Meta-analiza osam randomiziranih studija pokazala je da > 700 do 800 IU/dan vitamina D smanjuje frakture kuka i nevertebralne frakture [55].

### 1.1.11. Vitamin D

Poslednjih godina vitamin D je postao i predmet istraživanja kod obolelih od sarkoidoze kao još jedan potencijalni biomarker. Brojne studije ukazale su na značaj vitamina D i da postoji statistički značajnije niže vrednosti kod obolelih od sarkoidoze. Pokazano je takođe da se niske vrednosti vitamina D mogu smatrati i prognostičkim faktorom, odnosno upravo oni bolesnici koji imaju nisku vrednost vitamina D preći će u hroničnu formu bolesti. Neke publikacije su pokazale da kod bolesnika sa niskom vrednostim vitamina D postoji značajna statistička korelacija sa depresivnim sindromom i hroničnim zamorom [19, 56]. Međutim, uprkos tome, suplementacija vitaminom D kod pacijenata sa sarkoidozom je kontraproduktivna zbog hiperkalcemije. Odsta, nekoliko randomizovanih kontrolisanih studija upravo to i sugerišu, i štaviše, pokazuju da je suplementacija bez značaja i za osteoporozu i rizik od fraktura kod ovih pacijenata [57, 58].

#### 1.1.11.1. Vitamin D – uloga i biogeneza

Najpoznatija, klasična, uloga vitamina D je u održavanju homeostaze kalcijuma i fosfora preko efekata na intestinum, bubrege i kosti, u sprezi sa paratiroidnim hormonom. On stimuliše osteoblaste na diferencijaciju i deponovanje kalcifikovanog matriksa, dok u slučaju hipokalcemije, stimuliše mobilizaciju kalcijuma iz kosti, promovišući diferencijaciju prekursora osteoklasta. Fiziološke funkcije vitamina D van koštanog sistema su uočene još početkom prošlog veka, kada 1903. Dr. Finsen dobio Nobelovu nagradu za medicinu, oblast fiziologija, za otkriće da se koncentrisanom svetlošću mogu lečiti bolesti kao što je epidermalna forma tuberkuloza i lupus vulgaris. Danas je poznato da se receptor za vitamin D (VDR) nalazi na mnogim ćelijama, od ćelija crevnog epitela, beta ćelijama pankreasa, bronhijalnim ćelijama, ćelijama imunskog sistema, pojedinim endokrinim žlezdama, CNS –u [59-61].

Značaj vitamina D u imunskom sistemu je potvrđen otkrićem VDR-a u makrofagima, dendritičnim ćelijama i aktiviranim T i B limfocitima, kao i mogućnošću ovih ćelija da eksprimiraju CYP27B1, enzim koji konvertuje 25(OH)D u aktivnu 1,25(OH)D formu. Međutim, još uvek je nejasno da li povećanje koncentracije vitamina D u cirkulaciji ima efekte na njegovu lokalnu, parakrinu funkciju [62].

Danas se smatra da je veliki deo ljudske populacije u nedostatku vitamina D, usled načina života koji je značajno manja izloženost sunčevoj svetlosti i neadekvatne ishrane [63]. Međutim, čak i u uslovima optimalnog cirkulatornog nivoa efikasnost metabolisanja vitamina D, u smislu sposobnosti prevođenja neaktivne u aktivnu formu i katabolizam aktivne forme, može varirati među osobama. Uzrok je prisustvo genetičkih varijanti u VDR-u i vitamin D -metabolišućim enzimima uključenih u ove procese, koje utiču na aktivnost enzima, što dodatno komplikuje njegovu ulogu, a posebno suplementaciju.

Nizak serumski nivo povezan je sa spovećanom smrtnošću u slučaju kancera kolona, dojke i prostate, povećanom predispozicijom za autoimune bolesti i infektivne bolesti kao što je tuberkuloza, kao i većoj predisponiranosti za kardiovaskularne bolesti i hipertenziju [60, 64-66].

Međusobna interakcija relevantne izloženosti određenim faktorima, nedostatak vitamina D i podložan domaćin razvoju sarkoidoze ukazali su na ulogu genetskih polimorfizama u patogenezi ove bolesti [67]. Smatra se da genetičke varijante u genima koji učestvuju u prevođenju vitamina D u aktivnu formu, njegovom transporteru, njegovom receptoru kao i u enzimu koji ga razgrađuje, mogu doprineti patogenezi sarkoidoze, njenoj različitoj kliničkoj slici, kao i pojavi težih formi bolesti.

#### 1.1.11.2. Konverzija vitamina D u aktivnu formu

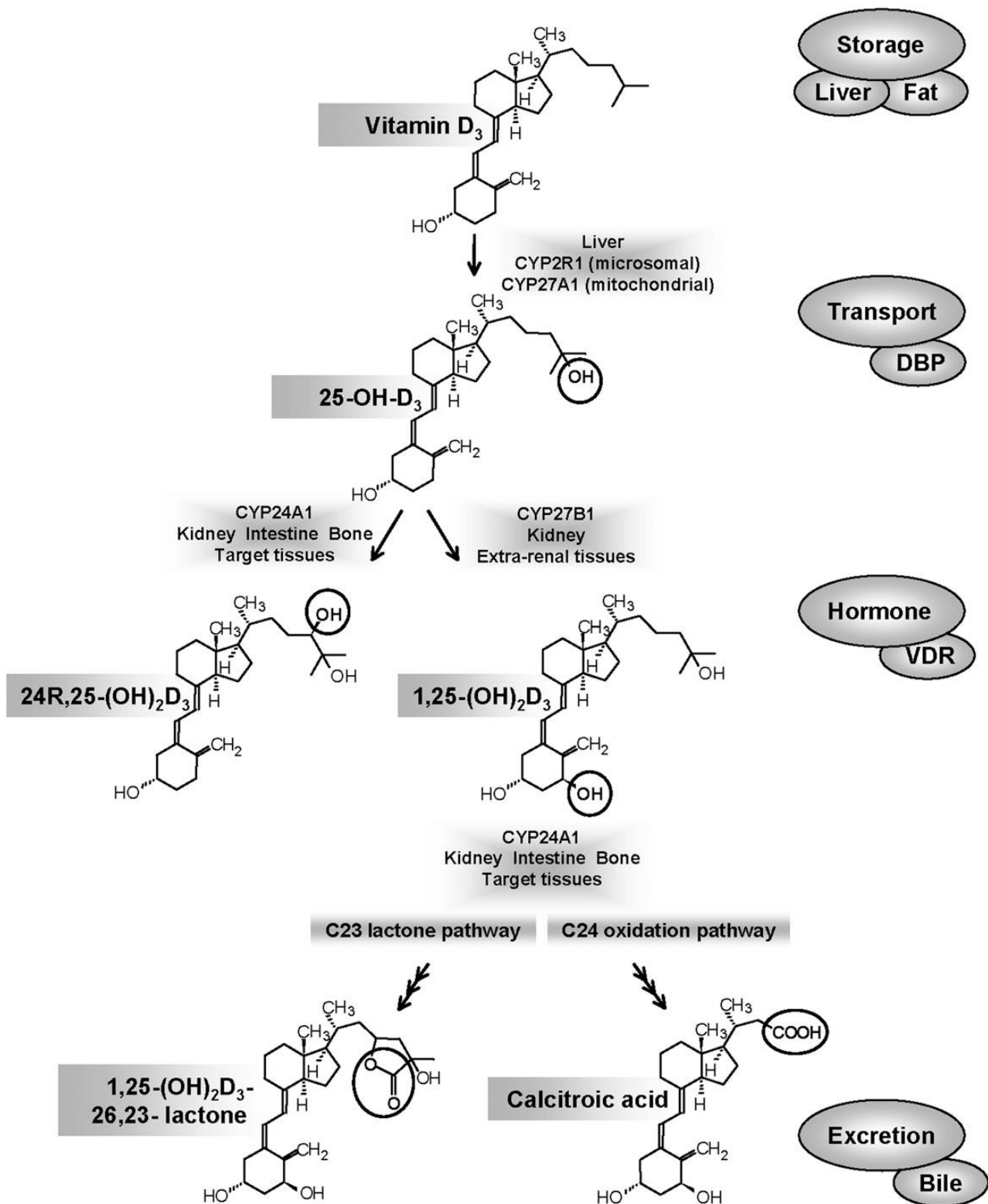
Nakon izlaganja sunčevim zracima, u koži počinje sinteza vitamina D iz prekursora 7-dehidroholesterol. Primarno stvoreni holekalciferol prolazi kroz dve konverzije, 25-hidroksilaciju u jetri [68], čime se stvara 25(OH)D - kalcidiol, i 1 $\alpha$ -hidroksilaciju u bubrezima i nekim van-bubrežnim ćelijama i tkivima [69, 70] pre nego postane hormonski aktivna forma-kalcitriol (1 $\alpha$ ,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>; 1,25(OH)<sub>2</sub>D), (Slika 4). Liposolubilni hormon vitamin D i njegovi metaboliti se transportuju vezivanjem za svoj transporter – DBP (*vitamin D-binding protein*), koji ima različit afinitet za različite forme vitamina D. Poslednja istraživanja, međutim pokazuju da osim transportne, ovaj protein ima i puferišuću ulogu, smanjujući toksičnost [71, 72].

Nekoliko citohrom P450 enzima (CYP), kao što su CYP2R1, CYP3A4, CYP27A1, CYP2D25, su sposobni da vrše 25-hidroksilaciju holekalciferola. Najnovija istraživanja su pokazala da je CYP2R1 fiziološki najrelevantniji [73].

Drugi korak hidroksilacije vrši enzim CYP27B1 [74, 75].

Inaktivacija vitamina D, uključujući obe forme 25(OH)D i 1,25(OH)<sub>2</sub>D, vrši se pod dejstvom mitohondrijalnog enzima CYP24A1 [76, 77], čime se dobijaju metaboliti rastvorni u vodi kalcitroična kiselina ili 26,23-lakton [78].

Svoje efekte vitamin D ostvaruje vezivanjem za sopstveni receptor (vitamin D receptor - VDR), koji se nalazi na mnogim ćelijama u organizmu i koji ima preko 2700 vezivnih mesta u genomu gena i reguliše ekspresiju preko 220 gena [79]. VDR reguliše aktivnost gena koji učestvuju u imunskom sistemu, metabolizmu ugljenih hidrata, kardiovaskularnom sistemu [60, 64]. Upravo ova činjenica govori o značajnoj ulozi vitamina D u zdravlju i bolesti.



**Slika 4.** Ključni koraci u prevođenju vitamina D u aktivnu formu. Prikazani su citohrom P450 enzimi i glavni metaboliti vitamina D. Druga dva proteina, DBP i VDR, igraju ključnu ulogu u transportu metabolita između tkiva i ključni molekuli signalne transdukcije (preuzeto iz Jones *et al.* 2014.)[\[78\]](#).

Status vitamina D u krvi utvrđuje se merenjem nivoa 25(OH)D, koji predstavlja njegov glavni cirkulišući oblik i smatra se za najbolji klinički indikator serumskog nivoa vitamina D, obzirom na stabilnost i dug poluživot (>15 dana) [\[80-82\]](#). Iako je 1,25(OH)<sub>2</sub>D (kalcitriol) aktivni metabolit vitamina D, samo mali deo 25(OH)D se konvertuje u aktivnu formu. Kalcitriol ima značajno kraći poluživot u plazmi (<15h), a takođe je utvrđeno i da pacijenti koji imaju deficijenciju vitamina D

imaju normalne ili čak povišene koncentracije ovog metabolita, tako da on ne predstavlja pouzdan parametar za određivanje nivoa vitamina D [83, 84].

### 1.1.11.3. Proteini uključeni u metabolički put vitamina D

- *Enzimi uključeni u hidroksilaciju*
- *25-hidroksivitamin D-1  $\alpha$  hidroksilaza (CYP27B1)*

Vitamin D 1-alpha-hidroksilaza je produkt *CYP27B1* gena, i ovaj enzim učestvuje u sintezi aktivne forme vitamina D - 1,25(OH)2D, koja se vezuje za vitamin D receptor. Ovaj enzim se nalazi u bubrezima, a prisutan je i drugim organima i ćelijama, kao što su makrofagi, kolon, koža, prostata i dojka [70, 85].

Regulacija ekspresije ovog enzima u bubrezima nalazi se pod kontrolom  $Ca^{2+}$  i  $PO_4$  jona, najverovatnije preko hormona PTH i kalcitonina [86-89]. Takođe, postoji i povratna regulacija VDR receptorom. U van- bubrežnim tkivima regulacija se vrši i preko tkivno-specifičnih faktora uključujući citokine. Pokazano je da je sinteza u makrofagima u granulomatoznim bolestima, kao što je sarkoidoza, regulisana proinflamatornim citokinima, kao što je interferon- $\gamma$  [90]. Ovo uključuje Janus kinase-signalnu transdukciju (JAK), mitogen –aktiviranu protein kinazu (MAPK) i nuklearni faktor-kappa B (NF-kappa B) [91, 92]. Koncentracija 1,25-(OH)2D je u ćelijama i tkivima koji eksprimiraju svoj enzim veća nego u tkivima koja su pod kontrolom klasičnog bubrežnog enzima, te se smatra da je funkcija postojanja ovog enzima na njima potreba za povećanom količinom ovog produkta na lokalnom ćelijskiom/tkivnom nivou [78].

- *Vitamin D 25-hidroksilaza (CYP2R1)*

Nekoliko enzima, kao što su CYP3A4, CYP27A1 i CYP2D25 sposobni su da vrše 25-hidroksilaciju vitamina D. Međutim, eksperimentalno je potvrđeno da je CYP2R1 fiziološki relevantna vitamin D-25-hidroksilaza koja vrši konverziju vitamina D u 25(OH)D. CYP2R1 je protein od 501 aminokiseline koji se eksprimira u jetri. Pripada familiji mikrozomalnih citohrom P450 proteina, i visoko je konzervisan u različitim vrstama, što govori o njegovom značaju [93]. Ovaj enzim je sposoban da hidroksiliše obe forme vitamina D (vitamin D2 and vitamin D3) u fiziološki relevantnim koncentracijama supstrata [94].

- *Vitamin D-vezujući protein (DBP)*

DBP (*vitamin D-binding protein*) ili GC (*Group-specific Component*) je protein koji se vrlo rano javio u evoluciji kičmenjaka i najstariji je otkriveni član familije albuminoidnih proteina. Svi članovi ove familije uključeni su u transpport masnih kiselina i hormona. DBP ima jedno mesto za vezivanje svih vitamin D metabolita i ima visok afinitet za 25OHD and 1,25(OH)2D. Time se stvara veliki rezervoar cirkulišućeg vitamina D, i sprečava njegova deficijencija [95]. Glavno mesto sinteze ovog proteina je jetra, ali se sintetise u manjim količinama i u bubrezima, testisima,  $\beta$  ćelijama pankreasa i masnim ćelijama [96]. DBP se vezuje za membranske proteoglikane na leukocitima i učestvuje u hemotaksiji neutrofila [95]. Time je vitamin D direktno uključen u funkciju imunog sistema.

- *Vitamin D receptor (VDR)*

Vitamin D receptor je član superfamilije nuklearnih receptora steroidnih hormona, odnosno ligand aktivirajući transkripcioni faktor. Nuklearni receptori reaguju kao ligand inducibilni transkripcioni faktori koji interaguju kao monomeri, homodimeri ili heterodimeri sa retinoid X receptorom (RXR). Vitamin D-VDR kompleks heterodimerizuje sa RXR, inicira kaskadu makromolekulskih interakcija i vezuje jakim afinitetom za vitamin D reagujuće elemente (VDREs) u promotorima ciljnih gena.

Sam vitamin indukuje ekspresiju gena koji kodira D-24-hidroksilazu (*CYP24A1*), enzim koji vrši njegovu razgradnju i slabljenje signala vitamina D u ćeliji [97].

Četiri polimorfizma rs2228570 (*FokI*), rs1544410 (*BsmI*), rs7975232 (*ApaI*) i rs731236(*TaqI*) VDR gena su intenzivno proučavani u cilju pronalaženja njihove povezanosti sa različitim bolestima, među kojima su infektivne bolest, tumori različite lokalizacije, autoimune bolesti i druge [98-101].

### 1.1.12. Terapija sarkoidoze

Terapijski principi lečenja obolelih od sarkoidoze ne podležu strogim definicijama, već je individualni pristup za svakog pojedinog pacijenta. Cilj efikasnog lečenja je izlečenje ukoliko je moguće, a svakako poboljšanje i otklanjanje simptoma bolesti i poboljšanje kvaliteta života obolelih. Prvi i neophodni korak je evaluacija oboljenja, odnosno raspostranjenost i zahvaćenost pojedinih organa. Klinički tok same sarkoidoze može ići ka spontanoj remisiji ukoliko nema znakova zahvaćenosti ostalih organa. Ovi pacijenti zahtevaju kliničko praćenje i terapijski tretman nije potreban. U slučajevima kada postoje izražene tegobe pacijenata, dijagnoza postavljena patohistološki neophodna je terapija. Kortikosteroidi i dalje predstavljaju terapiju prvog reda u lečenju kako akutne forme bolesti tako i kod sarkoidoze sa izraženim simptomima, poremećajem plućne funkcije i znacima diseminacije bolesti (Tabela 2). Terapija oralnim kortikosteroidima rezultira remisijom respiratornih simptoma, poboljšanjem nalaza na radiografiji grudnog koša kao i popravljanjem plućne funkcije [47]. Inicijalna doza u plućnoj formi bolesti iznosi 20-40 mg prednizona dnevno. Veće doze se primenjuju u sarkoidozi srca i neurosarkoidozi [44]. Hiperkalciurija je takodje jedan od parametara za započinjanje terapije kortikosteroidima. Pacijenti u I i II stadijumu plućne bolesti pokazuju odličnu remisiju pod uticajem kortikosteroida. Pacijenti u III radiografskom stadijumu bolesti u oko 30% pokazuju pogoršanje i progresiju bolesti bez obzira na primenu kortikosteroidne terapije. Bez efekta je primena kortikosteroida u IV stadijumu bolesti. Ponekad hronične forme bolesti i pored nižih morbobatkih doza od 5-15mg/24 h dolazi do pogoršanja opštih tegoba, najčešće i progresije radiografskog nalaz, kao i biomarkera sarkoidoze i funkcionalnih testova. Takve forme bolesti, da bi se izbegli neželjeni efekti dugotrajne kortikosteroidne terapije zahtevaju alternativne tretmane kao što je metotrexat, antimalarici, biološka terapija [102].



**Tabela 2.** Terapija sarkoidoze

<b>Terapija sarkoidoze- modaliteti</b>			
<b>Kategorija leka</b>	<b>Naziv leka</b>	<b>Uobičajena doza</b>	<b>Specijalno praćenje</b>
Antiinflamatorna terapija	<i>Prednisone</i>	5-40mg	Osteoporoza (prevencija)
	<i>Naprosyn</i>	225-500mg	
Antimikrobna terapija	<i>Hydroxychloroquine</i>	200-400mg	Očni pregled na 6-12 meseci
	<i>Minocycline</i>	100-200mg	
Citostatska terapija	<i>Methotrexate</i>	10-15mg nedeljno	KKS, kontrola jetre i bubrežne funkcije na 1-2 meseca
	<i>Azathioprine</i>	50-200mg dnevno/ <i>a day</i>	Isto
	<i>Leflunamide</i>	10-20mg dnevno/ <i>a day</i>	Isto
	<i>Cyclophosphamide</i>	50-150mg oralno/ 24h ili 500-2000mg i.v. na 2-4 nedelje	Isto
Modulatori citokina	<i>Pentoxiphylline</i>	200-400mg dnevno	
	<i>Thalidomide</i>	50-200mg dnevno	Test na trudnoću
	<i>Infliximab</i>	3-5mg/kg inicijalno, i druge nedelje, potom na 4-8 nedelja	PPD obavezan pre početka terapije

Uloga genetičkih faktora u patogenezi sarkoidoze još uvek nije u potpunosti rasvetljena. Značaj vitamina D u ovom oboljenju je odavno je poznat, ali je sa sticanjem saznanja o ulozi pojedinih gena koji učestvuju u konverziji pro-vitamina D u aktivnu formu vitamina D kao i transdukciji signala do jedra slika postala komplikovanija i značajnija. Do sada su objavljene studije koje su se bavile ispitivanjem pojedinih polimorfizama u genima signalnog puta vitamina D, ali sa kontradiktornim rezultatima.

## 2. Cilj

Imajući u vidu značaj uloge vitamina D u sarkoidozi, ova studija je postavila sledeće ciljeve:

1. Uporediti nivoe serumskog vitamina 25(OH)D među pacijentima obolelim od sarkoidoze
2. Ispitati vezu nivoa vitamina D sa različitim kliničkim tokom bolesti.
3. Ispitati vezu između varijanti u genima DBP (rs7041; rs4588), CYP2R1 (rs10741657), CYP27B1 (rs10877012), i VDR (rs2228570) i sarkoidoze,
4. Ispitati veze između navedenih polimorfizama i serumskih nivoa 25(OH)D kod pacijenata sa sarkoidozom.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Ispitanici**

Ovo istraživanje je odobrio Etički odbor Kliničkog centra Srbije, a studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Svi učesnici su obavešteni o zahtevima i ciljevima studije i dali su informisani pristanak.

Za pacijente sa sarkoidozom, uključujući kriterijumi su bili postavljena dijagnoza sarkoidoze, uzeta je detaljna anamneza o znacima i simptomima bolesti, rendgenografija grudnog koša, i kod svih pacijenata su učinjena funkcionalna ispitivanja pluća. Svi slučajevi su imali patohistološki verifikovanu sarkoidozu, definisana kao oblik koji ima simptome i znake bolesti, kao i parametre aktivnosti, prisutne bar dve godine. Kriterijumi za isključivanje iz studije su bili: dijabetes melitus, ishemijska bolest srca, hronična bubrežna slabost, žutica ili seropozitivnost na HBs antigen, HCV ili HIV.

Kontrolu su činili zdravi pojedinci koji su pristali da učestvuju u studiji.

U studiji je učestvovalo 86 pacijenata sa sarkoidozom (64 osobe ženskog i 22 osobe muškog pola) prosečne starosti  $48.7 \pm 10.2$  i 50 zdravih ispitanika (31 osoba ženskog i 19 osoba muškog pola) sa prosekom godina  $39.2 \pm 11.3$ . Svi ispitanici su regrutovani u periodu od januara 2015. do decembra 2016. godine, na Klinici za pulmologiju Kliničkog centra Srbije. Na dan kad je uzeta krv za genotipizaciju i određivanje 25(OH)D, uzeta je i detaljna anamneza o toku i trajanju bolesti.

##### **3.1.1. Uzorkovanje krvi**

Uzorak periferne krvi dobijen je iz kubitalne vene kod ispitanika obe grupe. Tri mililitra su uzeta u epruveti za serum i u roku od 2h centrifugiranjem je izdvojen serumu u Biohemijskoj laboratoriji Kliničkog centra Srbije. Serum je zatim čuvan na  $-20^{\circ}\text{C}$  u cilju određivanja koncentracije vitamina D. Dva mililitra periferne krvi su uzorkovana u epruvetu sa EDTA kao antikoagulansom, a potom zamrznuta na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Uzorak je nakon toga prebačen u Laboratoriju za molekularnu biomedicinu Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo za dalju DNK analizu.

##### **3.1.2. Analiza serumskog 25(OH)D**

Koncentracija vitamina D (25(OH)D) je merena korišćenjem Elecsys Vitamin D total testa (Roche Diagnostics GmbH, Manhajm, Nemačka (REF 05894913190)). Test je baziran na elektro-hemijsko-luminiscenciji (ECLIA).

Pozivajući se na referentne vrednosti, serumski nivoi vitamina D su podeljeni na:

teška deficijencija: serumski nivoi 25(OH)D ispod 10mg/l;

insuficijencija: serumski nivoi 25(OH)D između 10 i 30mg/l;

normalan nivo: serumski nivoi preko 30mg/l;

toksičnost: serumski nivoi preko 100mg/l.

##### **3.1.3. Detekcija genetičkih varijanti**

U ovom radu su analizirane genetičke varijante u genima metaboličkog puta vitamina D: *VDR* (rs2228570 C>T), *DBP* (rs7041 T>G; rs4588C>A), *CYP27B1* (rs10877012 C>A), i *CYP2R1* (rs10741657 G>T). Za dizajn prajmera i analizu prisustva genetičke varijante korišćene su referentne sekvence:

*VDR*: NG\_008731.1

*CYP27B1*: NG\_007076

*DBP* : NG\_012837.2

*CYP2R1*: NG\_007936.1

### 3.1.4. Izolacija DNK

Genomska DNK je izolovana iz periferne krvi korišćenjem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača i čuvana je na -20°C do analize. Detekcija varijanti u genima *VDR* (rs2228570), *CYP27B1* (rs10877012), *DBP* (rs7041; rs4588) *CYP2R1* (rs10741657), je urađena pomoću PCR-RFLP (engl. *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) metode. Prajmer sekvence i PCR-RFLP uslovi su dati u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Sekvence prajmera, uslovi PCR reakcije i restrikcioni enzimi korišćeni u PCR-RFLP analizi

	Forward	Reverse	Temperatura anilinga (°C)	PCR produkt (bp)	Restrikcioni Enzim
CYP2R1 rs10741657	GGGAAGAGC AATGACATG GA	GCCCTGGAAG ACTCATTTTG	56	287	<i>MnII</i>
CYP27B1 rs10877012	GTGTTCCCT AAGTGTGT CTC	GCTGACTCGG TCTCCTCTG	56	666	<i>TfiI</i>
DBP rs7041; rs4588	AAATAATGA GCAAATGAA AGAAGAC	CAATAACAGC AAAGAAATG AGTAGA	57	483	rs7041/ <i>HaeIII</i> rs4588/ <i>StyI</i>
VDR rs2228570	AGCTGGCCC TGGCACTGA CTCTGGCT	ATGGAAACA CCTGCTTCTT CTCCCTC	57	266	<i>FokI</i>

### 3.1.5. Statistička obrada

U ovoj tezi su korišćene deskriptivne i analitičke statističke metode. Kontinuirane varijable su prikazane kao aritmetička sredina (standardna devijacija) ili medijana (25 ili 75 percentil), u zavisnosti od njihove distribucije. Nominalni podaci su predstavljeni kao apsolutni broj i procenat slučajeva. Za kontinuirane varijable, distribucija je ispitivana matematičkim i grafičkim metodama. Hardy-Vajbergova ravnoteža (eng. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) je testirana i kod pacijenata sa sarkoidozom i u kontrolnoj grupi.

Povezanost između genoma i sarkoidoze je procenjena korišćenjem logističke regresije, sa korekcijom za godine. Rezultati su predstavljeni kao OR sa intervalom od poverenja od 95%.

Korišćeni su dominantni i recesivni genetički model. U dominantnom modelu su poređeni dominantni homozigoti i heterozigoti prema recesivnim homozigotima. Recesivni model podrazumevao je poređenje recesivnih homozigota i heterozigota nasuprot dominantnim homozigotima. Veza između proučavanih gena i 25(OH)D koncentracije je određena pomoću  $\chi^2$  testa (kategorije vitamina D: <10, 10-30, >30mg/l) i Mann-Whitney testa (kontinuirane vrednosti vitamina D). Statistička značajnost je prihvaćena na nivou P vrednost 0,05. Statistička analiza je izvedena korišćenjem IBM SPSS Statistics for Windows. Ver 21.0, Armonk, Njujork: IBM Corp.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

## **4. REZULTATI**

### **4.1 Deskripcija pacijenata sa sarkoidozom**

U studiju je bilo uključeno ukupno 86 pacijenata prosečne starosti  $48.6 \pm 10.2$  godina, od kojih je najmlađi pacijent imao 27 godina, a najstariji pacijent je imao 66 godina. Srednja vrednost za godine kod kontrolne grupe bila je  $39.2 \pm 11.3$  (15-83), i postojala je statistički značajna razlika u ovom parametru između grupa ( $p < 0.001$ ). Stoga je u statističkoj obradi podataka korišćena korekcija za godine.

Učestalost muškaraca je bila tri puta manja od žena i iznosi 22 (25.6%) u odnosu na žene, 64 (74.4%). Prosečno trajanje bolesti bilo je  $5.9 \pm 5.2$  godina sa medijanom 4 (2-9). Akutni oblik bolesti imalo je 27 pacijenata (31.4%), dok je hronični oblik bio zabeležen kod 59 pacijenata (68.6%). Demografski, klinički i serološki parametri pacijenata i kontrolnih ispitanika koji su učestvovali u ovoj studiji prikazani su u Tabeli 3.

Iz Tabele 3. se vidi da su plućni oblik sarkoidoze najzastupljeniji, prisutan je kod 84 (97,7%), a vanplućni oblik kod 36 (41,9%) pacijenata. Najčešće zahvaćen organ kod vanplućnog oblika sarkoidoze je bio CNS, a najređe zahvaćeni organi su bili jetra, želudac, koštana srž i parotidna žlezda. U grupi pacijenata sa vanplućnim oblikom sarkoidoze nije bilo pacijenata manifestacijom bolesti na srcu, štitastoj žlezdi i nosu.

Većina pacijenata je bila na terapiji pronizonom (66.3%), manji deo na terapiji metotreksatom, a petina pacijenata je bila bez terapije. Približno jednako su bili zastupljeni Ro-0, R-01 i Ro-2 stadijum bolesti, dok je najmanji broj pacijenata imao Ro-3 stadijum (Tabela 4).

**Tabela 4.** Demografski, klinički i serološki parametri pacijenata i kontrolnih ispitanika

		Pacijenti	Zdrave kontrole
<b>Demografski podaci</b>			
<b>Broj</b>		86	50
<b>Starost</b>	Srednja vrednost $\pm$ SD	48.8 $\pm$ 10.2	39.2 $\pm$ 11.3
<b>Polna raspodela</b>	Žene	64 (74.4%)	31 (62.0%)
	Muškarci	22 (25.6%)	19 (38.0%)
<b>Klinički parametri</b>			
<b>Aktivnost bolesti</b>	Akutna	27 (31.4%)	
	Hronična	59 (68.6%)	
<b>Zahvaćenost organa</b>	Pluća	84 (97.7%)	
	CNS	14 (16.3%)	
	Koža	4 (4.7%)	
	Oko	8 (9.3%)	
	Jetra	1 (1.2%)	
	Slezina	3 (3.5%)	
	Limfni čvor	7 (8.1%)	
	Kosti	2 (2.3%)	
	Želudac	1 (1.2%)	
	Parotidna žlezda	1 (1.2%)	
	Kostna srž	1 (1.2%)	
	<b>Ro stadijum</b>	0	24 (27.9%)
1		30 (34.9%)	
2		28 (32.6%)	
3		4 (4.7%)	
<b>Vitamin D status (mg/l)</b>	<10	38 (44%)	
	10-30	43 (50%)	
	>30	5 (5.8%)	
<b>Terapija</b>	Prednizon	57 (66.3%)	
	Metotreksat	4 (4.7%)	
	Prednizon+metotreksat	2 (2.3%)	
	Bez terapije	23 (26.7%)	

Biohemijske analize kod svih pacijenata zajedno prikazane su u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Biohemijske analize kod pacijenata sa sarkoidozom

Biohemijski parametar	$\bar{x}\pm sd$	Mediana (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentil)
D3	13,64 $\pm$ 9,42	10.80 (6.36-17.98)
Ca 24h	4,35 $\pm$ 1,90	4,06 (3,10-5,30)
sCA	2,25 $\pm$ 0,10	2,26 (2,20-2,30)
ACE	42,99 $\pm$ 24,46	40,50 (27,00-51,00)
hitortiozidaza	184,51 $\pm$ 220,77	114,20 (54,00-192,00)

Plućna funkcija pacijenata sa sakroidozom je prikazana u Tabeli 6.

**Tablela 6.** Plućna funkcija pacijenta sa sarkoidozom

Plućna funkcija	$\bar{x} \pm \text{sd}$	Med (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentil)
FVCI	3,81±1,26	3,59 (2,98-4,38)
FVCP	105,15±16,18	106,00 (97,00-115,00)
FEV1L	2,89±0,96	2,84 (2,20-3,39)
FEV1P	97,43±18,36	98,50 (86,00-109,00)
FEV1PFVC	78,95±9,41	80,20 (74,41-85,60)
Tiffno	79,99±9,97	79,50 (75,24-85,80)
PEFL	8,31±9,27	7,13 (5,94-8,60)
PEFP	101,91±22,32	104,00 (88,00-111,00)
DCo	6,91±2,18	6,66 (5,66-7,86)
Kco	1,55±0,73	1,50 (1,31-1,63)
KcoP	90,76±15,15	92,00 (82,00-100,00)

Prosečne vrednosti parametara plućne funkcije su iznosili 6,91±2,18 za difuzni kapacitet za ugljen monoksid je iznosila, 1,55±0,73 za KCo i 90,76±15,15 za KcoP.

Najučestaliji simptom sarkoidoze je bio kašalj, a najređe su se javljale simptomi oštećenja kranijalnih nerava. Distribucija pojedinih simptoma sarkoidoze je prikazana u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Distribucija pojedinih simptoma kod pacijenata sa sarkoidozom

		<b>Broj pacijenata</b>	<b>%</b>
Kašalj	da	66	76.7%
	ne	20	23.3%
Zamaranje	da	60	69.8%
	ne	26	30.2%
Bolovi u grudima	da	23	26.7%
	ne	63	73.3%
Otežano disanje	da	27	31.4%
	ne	59	68.6%
Bolovi u kostima	da	28	32.6%
	ne	58	67.4%
Kožne promene	da	10	11.6%
	ne	76	88.4%
Glavobolje	da	15	17.4%
	ne	71	82.6%
Diplopije	da	7	8.1%
	ne	79	91.9%
Kranijalni nervi	da	2	2.3%
	ne	84	97.7%
Otoci u zglobovima	da	20	23.3%
	ne	66	76.7%
Probemi sa snom	da	24	27.9%
	ne	62	72.1%

Rezultati deskriptivne statistike skala zamora i depresije kod svih pacijenata zajedno prikazana je u Tabeli 8.

**Tabela 8.** Skale zamora i depresije

<b>Skale zamora</b>	<b>x±sd</b>	<b>Mediana (25<sup>th</sup> -75<sup>th</sup> percentil)</b>
FAS	22,10±7,87	20,50 (15,00-26,00)
FAS ment	10,29±3,63	10,00 (8,00-12,00)
FAS physi	12,29±4,21	12,00 (9,00-15,00)
CESd	15,86±9,38	14,00 (9,00-20,00)

#### 4.1.1. Vitamin D i osnovne kliničke karakteristike bolesnika

U daljim analizama ispitivana je povezanost vitamina D sa opštim karakteristikama pacijenata, simptomatologijom, stadijumom i trajanjem bolesti, lokalizacijom sakroidoze.



#### 4.1.1.1. Starost pacijenata

Na osnovu korelacione analize utvrđeno je da nema statistički značajne povezanosti starosti pacijenata i koncentracije vitamina D kod obolelih od sarkoidoze ( $Rho=0,141$ ;  $p=0,196$ ), a evidentno je da se radi o slaboj povezanosti, pozitivnog smera i bez statističke značajnosti.

#### 4.1.1.2. Trajanje i oblik bolesti

Povezanost koncentracije vitamina D sa trajanjem bolesti je u obrnutoj korelaciji, slabe jačine i bez statističke značajnosti. Takođe, nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji vitamina D između pacijenata sa akutnim i hroničnim oblikom bolesti

#### 4.1.1.3. Uticaj pola i starosti na nivo vitamina D

Prosečne vrednosti vitamina D bile su gotovo identične kod muškog i ženskog pola. Međutim, kada se posmatraju kategorije Vitamina D, pokazano je da mlađi pacijenti imaju niže vrednosti vitamin D3 ( $<10\text{mg/l}$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Deskripcija osnovnih karakteristika prema kategorijama vitamina D

		Vitamin D (mg/l)			
		N	$\bar{x}\pm\text{sd}$	Mediana (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentil)	$p^a$
Godine	<10	37	46,81±9,85	46,00 (41,00-54,00)	0,037*
	10-30	44	49,43±10,73	52,00 (42,00-57,00)	
	>30	5	55,60±1,67	56,00 (55,00-57,00)	
Trajanje Bolesti	<10	37	6,74±4,87	6,00 (2,00-10,00)	0,121
	10-30	44	5,20±5,62	3,00 (1,00-8,50)	
	>30	5	5,60±2,88	5,00 (4,00-8,00)	

<sup>a</sup>Kruskal Wallis test

#### 4.1.1.4. Zahvaćenost organa

U daljoj analizi ispitivana je razlika koncentracije vitamina D u odnosu na to koji je organ zahvaćen. Deskriptivna statistika sa rezultatom testiranja prema lokalizaciji bolesti je prikazana u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Deskripcija koncentracije vitamina D prema lokalizaciji sarkoidoze

		D3			
		N	x±sd	Mediana (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentil)	p <sup>a</sup>
Pluća	ne	2	16,06±9,96	16,06 (9,02-23,10)	0,633
	da	84	13,58±9,47	10,80 (6,33-17,79)	
CNS	ne	72	13,69±9,66	10,67 (6,33-18,00)	0,861
	da	14	13,39±8,41	12,20 (6,81-16,52)	
Koža	ne	82	13,65±9,25	11,00 (6,81-17,98)	0,584
	da	4	13,48±14,32	7,60 (4,95-22,00)	
Oči	ne	78	13,58±9,61	10,67 (6,36-17,98)	0,586
	da	8	14,20±7,83	14,14 (7,47-20,35)	
Slezina	ne	83	13,87±9,49	10,80 (6,81-18,02)	0,242
	da	3	7,28±3,83	5,80 (4,40-11,63)	
Limfni nodus	ne	79	13,66±9,71	10,53 (6,30-18,02)	0,580
	da	7	13,45±5,59	14,48 (9,02-15,96)	

<sup>a</sup>Mann Whitney test

Iz tabele se vidi da u prosečne vrednosti vrlo slične, bez obzira da li je navedeni organ zahvaćen ili ne. Nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji vitamin D kod pacijenta koji su imali lokalizovanu bolest na plućima, CNS-u, koži, očima, sklezini i limfnim nodusima u poređenju sa pacijentima koji nisu imali lokalizovanu bolest na ovim organima.

#### 4.1.1.5. Ro stadijum i terapija

Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji vitamina D između pacijenata na različitoj terapiji, kao ni u različitim Ro stadijumima bolesti (Tabela 11).

**Tabela 11.** Uticaj koncentracije vitamin D na Ro stadijum i terapijski izbor

		D3			
		N	x±sd	Med (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentil)	p <sup>a</sup>
Terapija	bez terapije	23	14,13±9,53	12,10 (5,90-21,60)	0,903
	pronizon	57	13,70±9,63	10,80 (6,81-17,60)	
	metotreksat	4	11,18±10,01	7,82 (3,95-18,41)	
	pronizon+ metotreksat	2	11,05±3,32	11,05 (8,70-13,40)	
Ro Stadijum	0	24	16,79±11,38	13,21 (9,01-23,45)	0,264
	1	30	11,47±7,11	9,65 (5,90-16,52)	
	2	28	13,89±9,65	12,22 (5,97-18,85)	
	3	4	9,27±6,60	7,54 (4,14-14,39)	

<sup>a</sup>Kruskal Wallis test

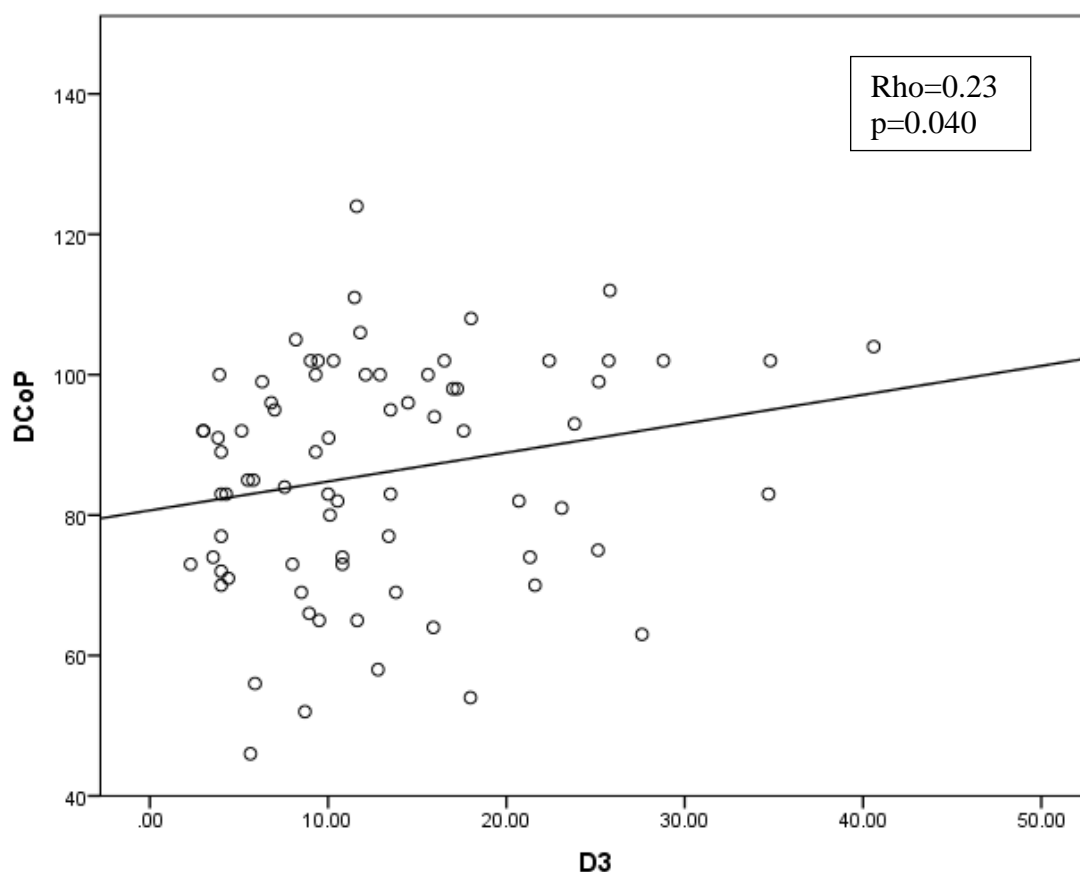
#### 4.1.1.6. Pulmološki parametri

Ispitivana je korelacija vitamina D sa parametrima plućne funkcije. Koncentracija vitamina D je značajno korelirala sa DcoP (Tabela 12.), i ta korelacije je slaba i pozitivnog smera (Slika 5).

**Tabela 12.** Korelacija koncentracije vitamina D sa parametrima plućne funkcije

	<b>D3</b>	
	Rho	P <sup>a</sup>
FVCi	0,084	0,441
FVCP	0,014	0,900
FEV1L	0,114	0,298
FEV1P	0,046	0,677
FEV1PFVC	0,051	0,643
Tiffno	0,032	0,772
PEFL	0,186	0,087
PEFP	0,090	0,408
DCo	0,088	0,453
DcoP	0,238	0,040*
Kco	0,011	0,926
KcoP	0,141	0,228

<sup>a</sup> Spearman ova korelacija



**Slika 5.** Korelacija vitamina D sa parametrima plućne funkcije

#### 4.1.1.7. Biohemijski parametri

Ispitivanje korelacije koncentracije vitamin D sa biohemijskim parametrima pokazalo je da postoji statistički značajna korelacija nivoa Ca ( $p=0,018$ ) sa koncentracijom vitamin D (Tabela 13).

**Tabela 13.** Korelacija koncentracije vitamin D i biohemijskih analiza

	<b>D3</b>		
	Rho	p <sup>a</sup>	N
Ca24h	0,255	0.018*	86
sCa	0,027	0.852	51
ACE	-0,001	0.990	86
hitotriozidaza	0,101	0.211	86

<sup>a</sup> Spearman ova korelacija

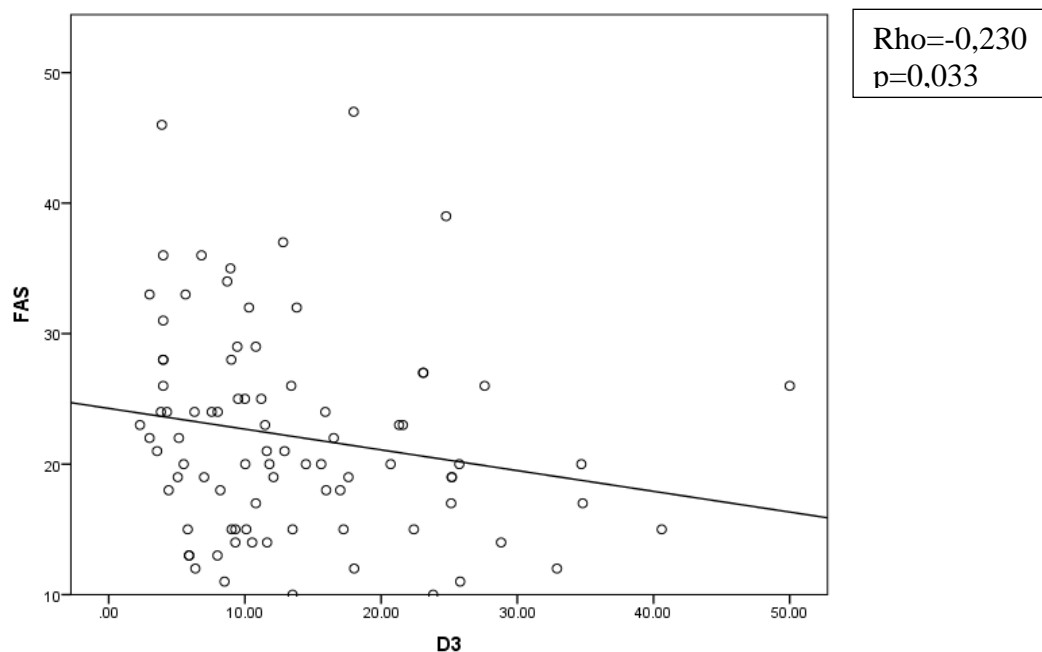
#### 4.1.1.8. Skale zamora i depresije

U Tabeli 14. prikazana je korelacija koncentracije vitamin D sa skalom zamora i depresije. Pokazano je da postoji negativna statistički značajna korelacija FAS ( $p=0.023$ ) i CESd skale ( $p=0.033$ ) sa koncentracijom vitamin D (Slika 6 i Slika 7)

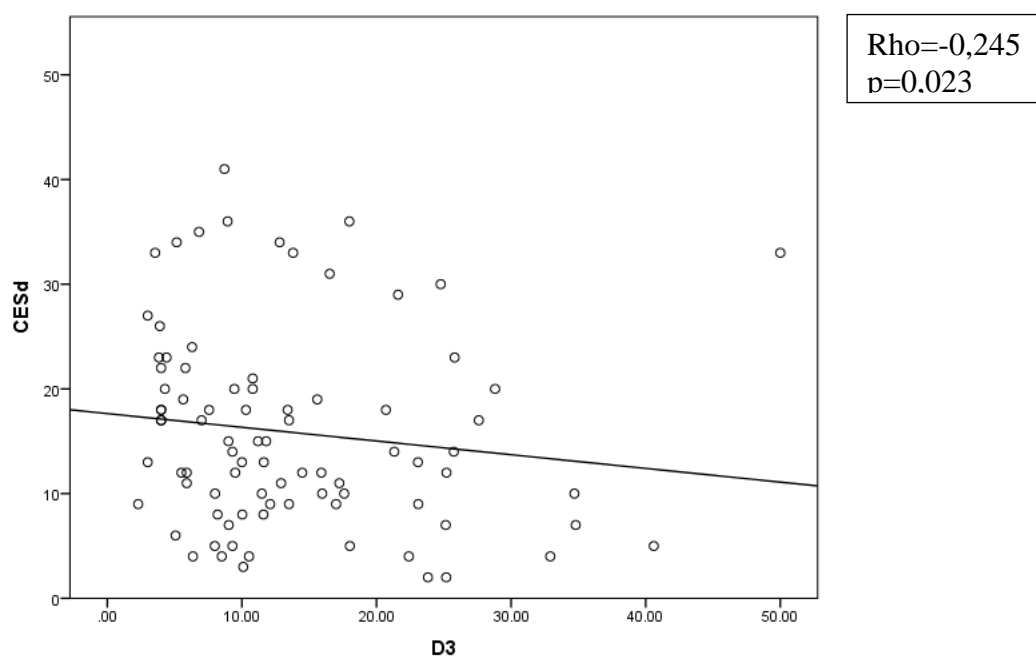
**Tabela 14.** Korelacija koncentracije vitamin D sa skalom zamora i depresije

	<b>D3</b>		
	Rho	p <sup>a</sup>	N
FAS	-0,245	0.023*	86
FASment	-0,151	0.236	63
FASphysi	-0,196	0.124	63
CESd	-0,230	0.033*	86

<sup>a</sup> Spearman ova korelacija



**Slika 6.** Korelacija koncentracije vitamina D i FAS kod pacijenata sa sarkoidozom



**Slika 7.** Korelacija nivoa vitamina D sa skalom depresije kod pacijenata sa sarkoidozom

#### 4.1.1.9. Simptomi u odnosu na Vitamin D

Deskriptivna statistika vitamina D sa rezultatom testiranja u odnosu na prisustvo ili odsustvo pojedinih simptoma prikazana je u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Deskripcija koncentracije vitamin D prema prisustvu i odsustvu pojedinih simptoma

		D3			p <sup>a</sup>
		N	x±sd	Mediana (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentil)	
Kasalj	ne	20	11,06±7,86	7,88 (4,74-18,61)	0,093
	da	66	14,42±9,77	11,54 (8,00-17,98)	
Zamaranje	ne	60	12,86±9,36	10,55 (5,57-17,30)	0,131
	da	26	15,43±9,50	12,50 (8,50-23,08)	
Bolovi u grudima	ne	23	10,98±6,77	9,00 (4,28-15,90)	0,151
	da	63	14,61±10,09	11,20 (7,00-21,32)	
Otezano disanje	ne	27	12,83±10,04	9,50 (5,80-17,98)	0,377
	da	59	14,01±9,19	11,20 (7,00-18,02)	
Bolovi u kostima	ne	58	13,28±9,14	11,00 (5,80-17,98)	0,662
	da	28	14,37±10,12	10,32 (7,77-17,81)	
Kožne promene	ne	10	11,87±6,81	9,22 (7,56-13,80)	0,746
	da	76	13,87±9,73	11,00 (6,10-19,36)	
Glavobolje	ne	15	14,08±12,10	9,44 (6,30-17,98)	0,793
	da	71	13,55±8,86	11,20 (6,36-18,02)	
Diplopije	ne	7	10,16±6,08	9,44 (3,55-16,52)	0,368
	da	79	13,95±9,63	10,80 (6,36-20,70)	
Kranijalni nervi	ne	2	11,62±3,08	11,62 (9,44-13,80)	0,895
	da	84	13,69±9,52	10,80 (6,33-18,00)	
Otoci zglobova	ne	20	12,79±10,62	9,47 (6,90-14,16)	0,465
	da	66	13,90±9,10	11,40 (5,90-20,70)	
Problemi sa snom	ne	24	12,43±11,24	8,97 (4,00-15,89)	0,100
	da	62	14,11±8,68	11,54 (7,98-18,02)	

<sup>a</sup> Mann Whitney test

Iz tabele se vidi da su u prosečne vrednosti nešto više kod pacijenata koji imaju odgovarajuće simptome, ali ova razlika nije statistički značajna. Takođe, ispitana je korelacija između koncentracije vitamina D3 i skora za simptome bolesti gde nije utvrđena statistički značajna korelacija ( $\rho=-0,172$ ,  $p=0,112$ ).

#### 4.1.1.10. COS skor

Ispitivanje korelacija između skora COS skora za bolesnike praćene duže od 5 godina hronične pacijente i nije bilo statistički značajne povezanosti ovog skora sa koncentracijom vitamin D3 ( $\rho = -0,202$ ,  $p = 0,211$ ).

#### 4.1.2. Analiza genotipa u grupi pacijenata sa sarkoidozom

U cilju utvrđivanja uticaja genotipa u genima metaboličkog puta vitamina D urađeno je poređenje nivoa serumskog vitamina D i prisustva određenog genotipa. Medijana serumskog nivoa vitamina D u ispitivanoj kohorti pacijenata sa sarkoidozom je bila 10.8mg/l, a 44% pacijenata je imalo izrazitu deficijenciju (serumski nivo vitamina 25(OH)D < 10 mg/l) (Tabela 16). Šta više, nosioci genotipa AA *DBP* rs4588 imali su najniže vrednosti vitamina D od 5.7mg/l, ukazujući da alel A predisponira za nizak nivo vitamin D.

**Tabela 16.** Nivo vitmina D kod pacijenata sa sarkoidozom

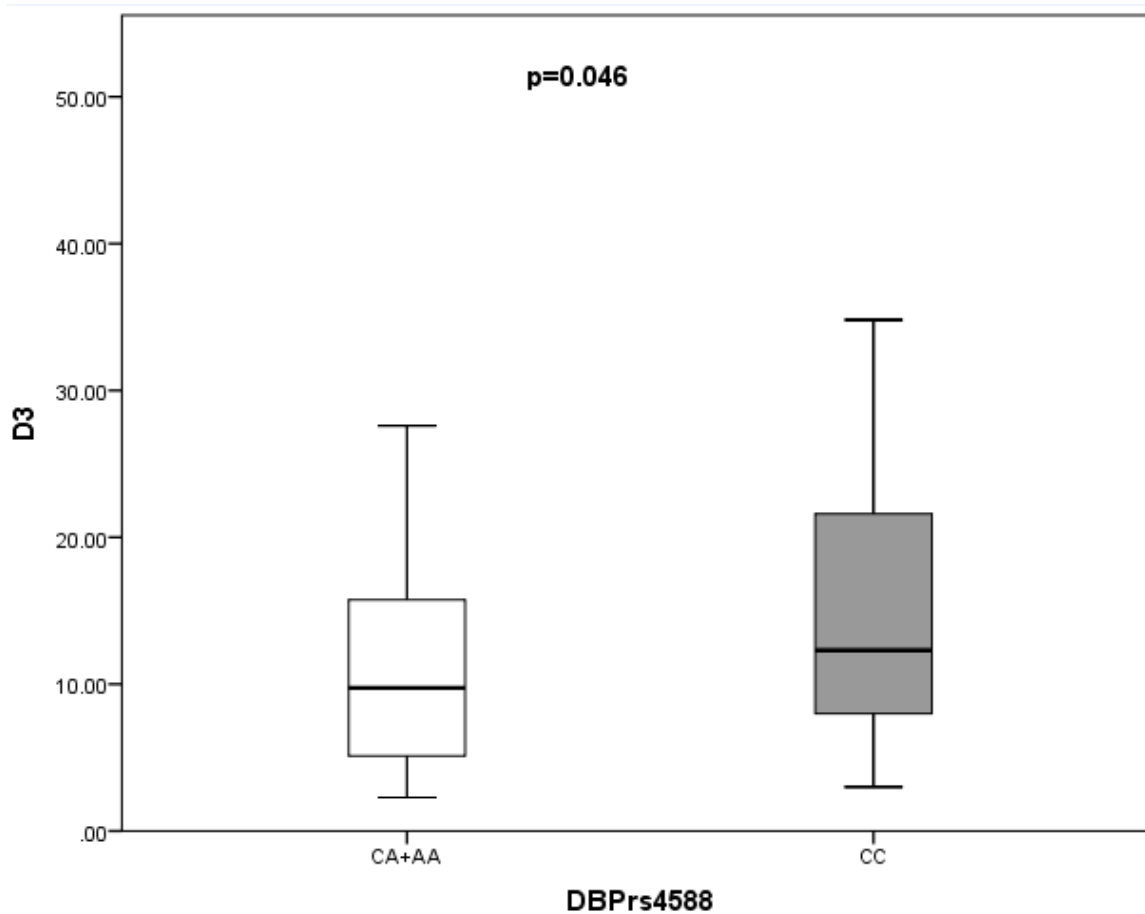
		D3 (mg/l)		
		Mediana	Percentil 25-75	br pacijenata
<b>VDR rs2228570</b>	TT	9.3	5.5-11.8	13
	CT	11.1	8.2-17.0	34
	CC	11.6	6.3-25.2	39
<b>CYP27B1 rs10877012</b>	CC	9.2	5.1-16.5	6
	CA	10.8	8.0-18.0	39
	AA	11.2	5.9-17.6	41
<b>DBP rs7041</b>	TT	9.8	4.0-20.7	18
	TG	10.0	5.8-15.9	39
	GG	12.8	8.5-21.3	29
<b>DBP rs4588</b>	AA	5.7*	4.0-16.0	10
	CA	10.0	5.8-15.6	34
	CC	12.3	8.0-21.6	42
<b>CYP2R1 rs10741657</b>	GG	10.6	7.0-17.0	34
	GA	11.2	5.9-18.0	42
	AA	10.9	6.3-18.0	10

Zatim je urađena analiza između određenih genotipova i serumskog nivoa vitamina D. Rezultati prikazani u Tabeli 17. su pokazali da su nosioci genotipa CA+AA rs4588 *DBP* gena imali niži nivo serumskog 25(OH)D (9.8 mg/l) u poređenju sa nosiocima CC genotipa (12.3 mg/l) i da je ova razlika statistički značajna ( $p = 0,046$ ) (Slika 8).

**Tabela 17.** Nivo vitamina D u odnosu na genotip

		D3 9.8 (mg/l)		p <sup>a</sup>
		Mediana	Percentil 25- 75	
<i>VDR</i>	CT+TT	10.3	6.8-16.0	0.308
	CC	11.6	6.3-25.2	
<i>CYP27B1</i>	CA+AA	11.0	6.6-18.0	0.599
	CC	9.2	5.1-16.5	
<i>DBP</i> rs7041	TT+TG	10.0	5.5-16.0	0.131
	GG	12.8	8.5-21.3	
<i>DBP</i> rs4588	CA+AA	9.8	5.1-15.8	0.046*
	CC	12.3	8.0-21.6	
<i>CYP2R1</i>	GG+GA	10.8	6.6-17.8	0.803
	AA	10.9	6.3-18.0	

<sup>a</sup>Mann Whitney test





**Slika 8.** Nivo vitamina D u odnosu na genotip rs4588 *DBP* gena. Srednja linija na boksu označava medijanu, boks reprezentuje 25-75% analiziranih podataka.

Analiziran je uticaj određenog genotipa gena metaboličkog puta vitamina D na oblik bolesti i polnu distribuciju i utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike među analiziranim grupama (rezultati nisu prikazani).

Ispitivan je uticaj genotipa na trajanje bolesti i ustanovljeno da genotip utiče na trajanje bolesti. Naime, trajanje bolesti je duže ukoliko je prisutan mutirani alel za gene *VDR* i *CYP2R1*, a kod gena *VDR* ukoliko su oba mutirana alela pristuna, trajanje bolesti je 2 puta duže. Rezultati su prikazani u Tabeli 18.

**Tabela 18.** Trajanje bolesti prema određenim genotipovima

		Trajanje bolesti			
		N	x±sd	Mediana (25 <sup>th</sup> -75 <sup>th</sup> percentil)	p <sup>a</sup>
<i>VDR</i> rs2228570	CC	39	5,24±4,50	3,00 (2,00-9,00)	0,021*
	CT	34	4,78±4,00	4,00 (1,00-8,00)	
	TT	13	10,73±7,25	11,00 (6,00-15,00)	
<i>CYP27B1</i> rs10877012	CC	6	5,17±5,27	3,00 (2,00-7,00)	0,954
	CA	39	5,78±5,28	4,00 (2,00-9,00)	
	AA	41	6,10±5,21	4,00 (1,00-10,00)	
<i>DBP</i> rs7041	GG	29	6,69±6,66	4,00 (2,00-12,00)	0,986
	GT	39	5,46±4,28	5,00 (2,00-9,00)	
	TT	18	5,53±4,36	4,00 (2,00-9,00)	
<i>DBP</i> rs4588	CC	42	5,94±5,96	3,50 (1,00-10,00)	0,459
	CA	34	6,22±4,38	5,00 (2,00-10,00)	
	AA	10	4,55±4,47	4,00 (1,00-6,00)	
<i>CYP2R1</i> rs10741657	AA	9	3,28±5,20	2,00 (1,00-2,00)	0,011*
	AG	43	7,40±5,70	6,00 (2,00-11,00)	
	GG	34	4,68±3,90	4,00 (1,00-7,00)	

<sup>a</sup>Kruskal Wallis test

Ispitivana je razlika učestalosti genskih varijanti prema postojanju vanplućnog oblika sarkoidoze, rezultati su prikazani u Tabeli 19.

**Tabela 19.** Distribucija vanplućnog oblika sarkoidoze prema različitim genskim varijantama

		Vanplućni oblik				p <sup>a</sup>
		ne		da		
		N	%	N	%	
<i>VDR</i> rs2228570	CC	24	61,54%	15	38,46%	0,662
	CT, TT	26	55,32%	21	44,68%	
<i>CYP27B1</i> rs10877012	CC	2	33,33%	4	66,67%	0,394
	AA, CA	48	60,00%	32	40,00%	
<i>DBP</i> rs7041	GG	15	51,72%	14	48,28%	0,489
	TT, GT	35	61,40%	22	38,60%	
<i>DBP</i> rs4588	CC	23	54,76%	19	45,24%	0,662
	CA, AA	27	61,36%	17	38,64%	
<i>CYP2R1</i> rs10741657	AA	7	77,78%	2	22,22%	0,293
	AG, GA	43	55,84%	34	44,16%	

<sup>a</sup>Hi-kvadrat test

Nema značajnih razlika u učestalosti vanplućnog oblika u grupama pacijenata u grupama sa različitim genetičkim varijantama.

#### 4.1.2.1. Uticaj genotipa na biomarkere sarkoidoze

Urađena je analiza uticaja određenog genotipa na serumske markere za sarkoidozu: koncentraciju kalcijuma, ACE i hitotriozidaza. Nije pronađena statistički značajna razlika u nivou analiziranih parametara sa prisustvom određenog genotipa.

#### 4.1.2.2. Poređenje genotipova između pacijenata sa sarkoidozom i kontrolnom grupom

U grupi pacijenata sa sarkoidozom je bilo 64 (74.4%) a u kontrolnoj grupi 31 (62.0%) žena. Nije bilo statistički značajne razlike prema polu između ispitivanih grupa ( $p=0.128$ ). Prosečna starost u grupi pacijenata sa sarkoidozom je bila  $48.7 \pm 10.2$ , a u kontrolnoj grupi  $39.2 \pm 11.3$  ( $p < 0.001$ ). Stoga je uvedena korekcija za godine pri svim analizama.

Ispitivana je distribucija genotipova i Hardi-Vajnbergova ravnoteža (HWE) u grupi bolesnika sa sarkoidozom i kontrolnoj grupi. Ispitivani genotipovi u obe ispitivane grupe su bile u HWE. Rezultati su prikazani u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Analiza Hardi-Vajnbergove ravnoteže kod bolesnika sa sarkoidozom i kontrolnoj grupi

		Pacijenti			Kontrole		
		N=86		HW <sup>a</sup>	N=50		HW <sup>a</sup>
		N	%		N	%	
<i>VDR</i> rs2228570	CC	39	45.3	0.229	22	46.0	0.129
	CT	34	39.5		25	50.0	
	TT	13	15.1		2	4.0	
	C	112			71		
	T	60			29		
<i>CYP27B1</i> rs10877012	CC	6	7.0	0.420	14	28.0	0.093
	CA	39	45.3		19	38.0	
	AA	41	47.7		17	34.0	
	C	51			47		
	A	121			53		
<i>DBP</i> rs7041	TT	18	20.9	0.469	6	12.0	0.160
	TG	39	45.3		29	58.0	
	GG	29	33.7		15	30.0	
	T	75			41		
	G	97			59		
<i>DBP</i> rs4588	CC	42	48.8	0.445	25	50.0	0.080
	CA	34	39.5		24	48.0	
	AA	10	11.6		1	2.0	
	C	118			74		
	A	54			26		
<i>CYP2R1</i> rs10741657	GG	34	39.5	0.582	28	56.0	0.648
	GA	42	48.8		18	36.0	
	AA	10	11.6		4	8.0	
	G	110			74		
	A	62			26		

<sup>a</sup> Hardy-Weinberg ekvilibrijum (HWE)

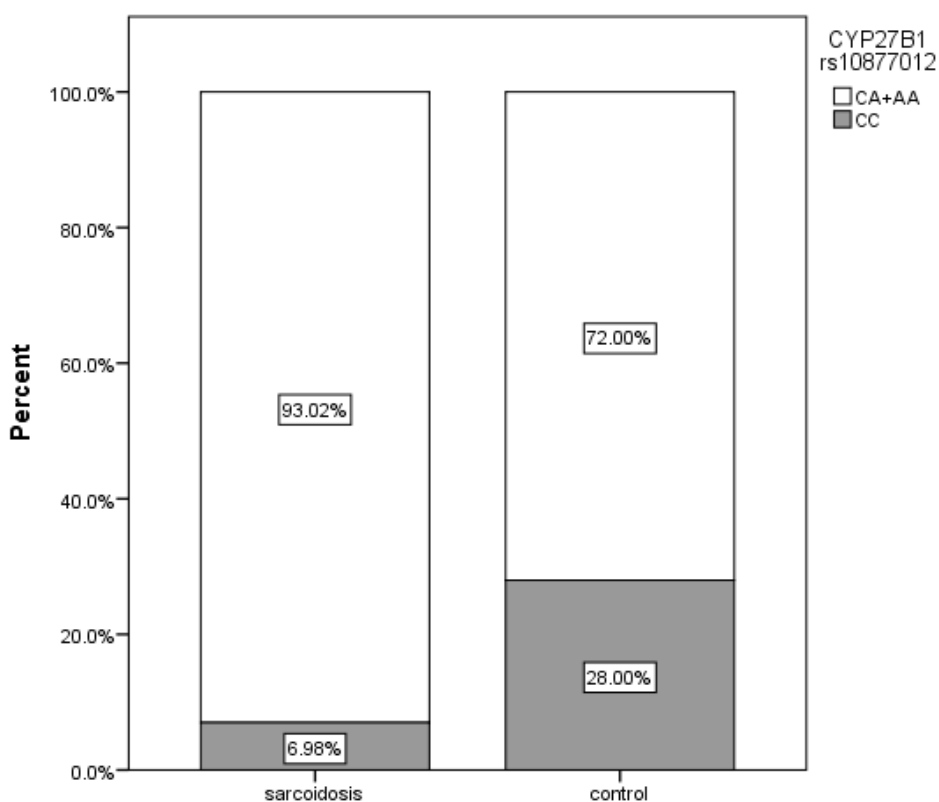
Sa ciljem da se utvrdi predisponirajući uticaj genotipa na nastanak sarkoidoze, ispitivana je distribucija mutiranih alela u grupi obelilih od sarkoidoze i kontrolnoj grupi, i određivan je OR za mutirane gene, rezultati su prikazani u tabeli 20. Rezultati su pokazali da su geni *CYP27B1* i *DBP* faktori koji imaju ulogu u nastanku sarkoidoze.

**Tabela 21.** Sumirani rezultati studije asocijacije ispitivanih genetičkih varijanti gena metaboličkog puta vitamina D i sarkoidoze

	<b>OR 95% CI</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
VDR rs2228570 CC vs CT+TT	0.922 0.428-1.987	0.837
CYP27B1 rs10877012 CC vs CA+AA	0.116 0.034-0.394	0.001*
DBP rs7041 TT vs TG+GG	1.763 0.597-5.204	0.304
DBP rs4588 AA vs CA+CC	8.856 1.006-77.953	0.049*
CYP2R1 rs10741657 GG vs GA+AA	0.542 0.251-1.170	0.119

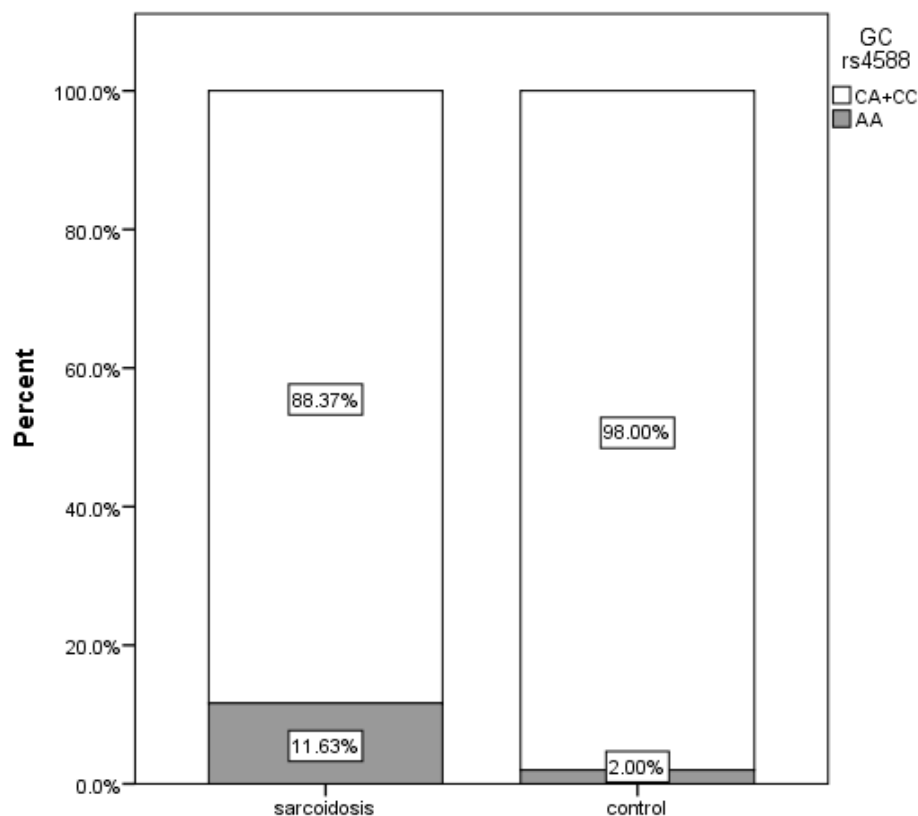
<sup>a</sup> logička regresija

Iz tabele 21 se uočava da je genotip CC *CYP27B1* gena statistički značajano učestaliji u kontrolnoj grupi u odnosu na grupu bolesnika, dakle CC genotip ima protektivno dejstvo u smislu oboljevanja od sarkoidoze i smanjuje rizik za oboljevanje deset puta (Slika 9).



**Slika 9.** Grafički prikaz asocijacije varijante rs10877012 *CYP27B1* gena kod pacijenata i kontrolnih ispitanika

Iz Tabele 21. se vidi da je genotip AA rs4588 DBP gena statistički značajno više prisutan kod obolelih i povećava 8 puta šansu od oboljevanja. Ovaj rezultat je prikazan i grafički na Slici 10.



**Slika 10.** Grafički prikaz asocijacije varijante rs4588 DBP gena kod pacijenata i kontrolnih ispitanika

#### 4.1.2.3. Asocijacija genotipa i serumskog nivoa vitamina D

Poređena je učestalost kategorija vitamin D (<10, 10-30, >30mg/l) u grupi pacijenata, a rezultati su prikazani u Tabeli 22.

**Tabela 22.** Učestalost kategorija vitamina D (<10, 10-30, >30mg/l) kod pacijenata sa sarkoidozom

		Vitamin D (mg/l)						p <sup>a</sup>
		<10		10-30		>30		
		Broj	%	broj	N %	broj	%	
VDR	CT+TT	21	44.7%	26	55.3%	0	0.0%	0.043*
	CC	16	41.0%	18	46.2%	5	12.8%	
CYP27B1	CA+AA	33	41.3%	42	52.5%	5	6.3%	0.589
	CC	4	66.7%	2	33.3%	0	0.0%	
DBP rs7041	TG+GG	28	41.2%	35	51.5%	5	7.4%	0.497
	TT	9	50.0%	9	50.0%	0	0.0%	
DBP rs4588	CA+CC	31	40.8%	40	52.6%	5	6.6%	0.633
	AA	6	60.0%	4	40.0%	0	0.0%	
CYP2R1	GA+AA	22	42.3%	26	50.0%	4	7.7%	0.654
	GG	15	44.1%	18	52.9%	1	2.9%	

<sup>a</sup> Hi kvadrat test

U grupi pacijenata sa normalnim vrednostima vitamina D ima 5 pacijenata (12.8%) sa genotipom CC, i razlika je statistički značajna u odnosu na nosioce genotipova TT i TC, što ukazuje da alel T predstavlja faktor za nizak nivo vitamina D.

## 5. DISKUSIJA

Ova studija je obuhvatila 136 ispitanika, od kojih je 86 ispitanika imalo dijagnozu sarkoidoze, dok je 50 ispitanika činilo kontrolnu grupu. Detaljno je utvrđen i opisan klinički status pacijenata, a zatim je proučavan nivo vitamina D kod pacijenata i njegov uticaj na različite kliničke parametre, kao što su oblik bolesti, trajanje, simptomi, pulmološki parametri, zahvaćenost organa i dr.

Prema brojnim studijama, vitamin D i sarkoidoza su u bliskoj vezi. Sarkoidoza se najčešće javlja u zimskim mesecima kada je nivo vitamina D nizak [54, 103]. Dalje, sarkoidoza je češća u oblastima koje su dalje od ekvatora. Nedostatak vitamina D i rizik od razvoja sarkoidoze je uobičajen kod tamno pigmentiranih pojedinaca i posebno je visok kod Afro-Amerikanaca koji žive u južnim Sjedinjenim Državama, i koji imaju veću učestalost nedostatka vitamina D. U ovoj populaciji se smatra da je sarkoidoza ozbiljna multisistemska bolest sa hroničnim tokom.

Većina pacijenata sa sarkoidozom ima simptome u vezi sa nedostatkom vitamina D kao što su: simptomatična osteomalacija sa bolom u kostima, osećaj zamora i iscrpljenosti. Rad Burka i saradnika [104] procenio je nivo vitamina D kod pacijenata sa sarkoidozom. Oni su otkrili da je 49% pacijenata imalo nivo vitamina 25(OH)D ispod 10mg/l. Rezultati naše studije su pokazali da je 44% naših pacijenata imalo izrazitu deficijenciju, odnosno serumski nivo vitamina 25(OH)D manji od 10 mg/l. Interesantan nalaz ove studije je i da su mlađi pacijenti (46,81±9,85god.) imali niže vrednosti vitamin D3 (< 10 mg/l).

Poremećaj metabolizma kalcijuma već dugo se smatra patognomoničnim za sarkoidozu, kod pacijenata sa hiperkalcemijom i hiperkalcijurijom. Povišene vrednosti kalcijuma u serumu i urinu su loš prediktorni pokazatelji i govore o aktivnosti bolesti. Hiperkalcijurija se zapaža daleko češće od hiperkalcemije. Vežu vitamina D i sarkoidoze su prvi prepoznali Harel i Fišer 1939. godine [105]. Oni su opisali pojavu hiperkalcemije kod 6 od 11 pacijenata sa sarkoidozom. Pre više od 7 decenija, ovi autori su došli do 3 važna zapažanja, a to je 1) da je hiperkalcemija je obeležje sarkoidoze, 2) konzumiranje hrane bogate vitaminom D rezultira pogoršanjem hiperkalcemije i 3) da vitamin D može biti povezan sa poremećajem kalcijuma kod sarkoidoze. Dvadeset godina kasnije zapaženo je da klinička manifestacija hiperkalcemije kod sarkoidoze jedan oblik intoksikacije vitaminom D i tako su utvrdili da se hormon stvara na ekstrarenalnoj lokaciji. Uprkos normalnim fiziološkim uslovima pod kojima se u potpunosti odvija sinteza kalcitriola u bubregu, utvrđeno je kalcitriol taj koji izaziva hiperkalcemiju kod sarkoidoze i da su makrofagi pacijenata sa aktivnom sarkoidozom dodatni izvor hormona. Nivo kalciferola je u korelaciji sa ekstenzivnošću sarkoidnih lezija.

U publikovanoj studiji Mihailovic-Vucinic V. i sar. [19] koja je obuhvatila 226 bolesnika sa patohistološki potvrđenom dijagnozom sarkoidoze, klinički oblik sarkoidoze bio je pretežno hronična forma bolest (63,7%) sa niskim nivoima vitamina 25(OH)D u serumu; kod pacijenata sa serumom 25(OH)D ispod 10 mg/L (117 pacijenata) svi su imali hroničnu bolest. Većina pacijenata sa visokim nivoom kalcijuma u uzorku 24h urina bili su pacijenti sa teškim nedostatkom vitamina 25(OH)D. Korelacija je bila statistički značajna, pokazujući dve činjenice: a) bolesnici sa hiperkalcijurijom imaju aktivnu sarkoidozu; tako da je aktivni oblik bolesti očigledno povezan sa niskim nivoom vitamina 25(OH)D; b) većina pacijenata sa hiperkalcijurijom ima aktivni sarkoidozu i preporučuje se da se izbegne sunčeva svetlost, a suplementacija vitamina D ili dijetetskog unosa takođe nije predložena. Kako vratiti nivo vitamina 25(OH)D je klinički ozbiljan problem u ovoj grupi pacijenata. Ovo pitanje postaje još ozbiljnije kada se smatra da pacijenti sa hroničnim tokom sarkoidoze imaju nivo 25(OH)D iznad 10 mg/ml. Ovim pacijentima je potrebna kontinuirana terapija kortikosteroidima, koja u morbestatskim dozama može dovesti do povećanja težine. Prethodne studije potvrdile su indeks telesne mase (BMI)> 25, koji je pronađen u ovoj grupi pacijenata sa sarkoidozom, kod više od 30% pacijenata. Gojaznost je povezana sa niskim serumskim nivoima vitamina D. Logično objašnjenje za takvo posmatranje je verovatno stil života osoba sa BMI> 25 (sedentarni, zatvoreni, ne izloženi sunčevoj svetlosti da bi sakrili prekomernu težinu). Osim toga, postoji činjenica da je vitamin D liposolubilna te da se unosi u masno tkivo. Zatim, u istoj studiji grupa pacijenata sa nivoom vitamina

D u serumu većim od 20 mg/l pokazuje veći nivo srednjeg forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) za 380 mL i forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (FEV1) za 220 mL u od nosu na grupu pacijenata sa nižim nivoom D vitamina. Utvrđeno je da nivo vitamina 25(OH)D u serumu ima statistički značajnu ulogu kao prediktor zamora i depresije kod obolelih od sarkoidoze. Insuficijencija 25(OH)D vitamina pokazala se kao važan faktor u predviđanju toka hronične bolesti, značajnih oštećenja plućne funkcije i kognitivnih poremećaja kao što su zamor i depresija. Činjenica da većina analiziranih bolesnika sa sarkoidozom ima potpuni nedostatak 25(OH)D u serumu upravo to i čini takav nalaz još značajnijim [19].

U prikazanoj studiji ispitivanje korelacije koncentracije vitamin D sa biohemijskim parametrima pokazalo je da postoji statistički značajna korelacija nivoa kalcijuma sa koncentracijom vitamin D. Ispitivanje parametara plućne funkcije je pokazalo da koncentracija vitamina D značajno korelira sa DcoP. Dodatno, pokazano je da postoji negativna statistički značajna korelacija FAS i CESd skale sa koncentracijom vitamin D.

Sadejstvo ekspozicije faktorima rizika, deficita vitamina D i podložnosti pojedinca je pokazalo bitnu ulogu genetičkih faktora u patogenezi sarkoidoze [38]. Smatra se da na sarkoidozu utiču brojni geni koji imaju ulogu u metabolizmu i signalnim putevima vitamina D. Proteini koje kodiraju CYP2R1, DBP, CYP27B1 i VDR geni igraju značajnu ulogu u metabolizmu vitamina D i u njegovoj konverziji u aktivan oblik.

CYP2R1 gen, sa genima CYP3A4 i CYP27A1, kodira 25-hidroksilazu koji pripada grupi citohorma P450. Varijanta rs10741657, analizirana u ovom radu, izučavana je u smislu uticaja na serumski nivo vitamina D, kao i u asocijativnim studijama kao faktor rizika za brojne bolesti. Pokazano je da alel G doprinosi nižem serumskom nivou vitamina D [106, 107].

DBP (vitamin D-vezujuću protein) je odgovoran za sintezu glavnog nosača vitamina D. DBP je kodiran visoko polimorfnim DBP genom u kome je pronađeno preko 120 polimorfizama. Oni većinom nisu okarakterisani i ne zna im se uloga. Najbolje izučene su dve varijante u kodonima 416 (GAT>GAG, Asp>Glu) i 420 (ACG>AAG, Thr>Lis) u egzonu 11 DBP gena (definisane prisustvom restrikcionijskih mesta za endonukleazu HaeIII i StyI). Ove varijante daju tri glavne elektroforetske varijante DBP, nazvane group-specific component 1 fast (Gc1F), Gc1 slow (Gc1S) i Gc2. Ove varijante se razlikuju po svojim funkcionalnim karakteristikama: varijante Gc1F i Gc1S imaju veći afinitet za 25(OH)D u odnosu na Gc2 varijantu [108]. To potencijalno dovodi do efikasnijeg transporta 25(OH)D do ciljnih tkiva, dok je Gc2 varijanta povezana sa smanjenom koncentracijom 25(OH)D, 1,25(OH)2D i DBP u cirkulaciji [109, 110].

CYP27B1 kodira citohrom P450 koji 1 $\alpha$ -hidroksilizuje 25(OH)D u 1,25(OH)<sub>2</sub>D oblik. Analizirana varijanta u CYP27B1 genu (rs10877012) je promotorska varijanta koja se nalazi na poziciji -1260 promotora ovog gena. Njen efekat na serumski nivo vitamina D je kontradiktoran u literaturi. Neke studije su pokazale da ima efekat regulacije nivoa vitamina D [111], dok drugi nisu potvrdili ovakav nalaz [112].

I konačno, VDR gen kodira receptor za vitamin D za koji se vezuje 1,25(OH)<sub>2</sub>D, stvarajući heterodimer koji sa retinoidnim X receptorom reguliše biološku aktivnost vitamina D [32, 36]. VDR je prisutan na dendričnim ćelijama, limfocitima i markofagama - ključnim ćelijama imuno- efektoru kod sarkoidoze. Pokazalo se da kalcitriol reguliše aktivaciju i proliferaciju limfocita kroz inhibiciju interleukina 2 (IL- 2) i interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Citokini kao što je IFN- $\alpha$  se takodje stvara dendričnim ćelijama na mestu inflamacije. Ekspresija IFN- $\alpha$  je regulisana vitaminom D koji može imati zadatak da smanji inflamaciju kod pacijenata sa autoimunim bolestima. Taj mehanizam je moguć i kod pacijenata sa sarkoidozom [22].

Mnogi polimorfizmi nalaze se u VDR genu i poručavani su u kontekstu različitih oboljenja. VDR FokI polimorfizam, izučavan u ovom radu, menja primarnu strukturu VDR proteina. Naime, FokI SNV se nalazi u drugom egzonu VDR gena, na prvom od dva mesta inicijacije translacije, tako da nukleotidna zamena T> C uzrokuje skraćivanje proteina za tri aminokiseline. Shodno tome, postoje dva oblika proteina: duga (prisustvo nukleotida T-f forma, dužine 427 aminokiselina) i kratka (prisustvo nukleotida C-F forma, dužine 424 aminokiseline). Ova dva oblika proteina se razlikuju po



svojoj transkripcionoj aktivnosti [113]. Pokazana je, između ostalog, veza VDR gena sa tuberkulozom u našoj populaciji [66].

Genetičke varijante proučavane u ovoj studiji su ukazale na značajan uticaj koji one imaju kako na kliničku sliku pacijenata, tako i na predispoziciju za dobijanje sarkoidoze. Pokazano je da *DBP* gen utiče na nivo vitamina D u smislu da su nosioci genotipa CA+AA rs4588 *DBP* gena u našoj kohorti ispitanika imali statistički značajno niži nivo serumskog 25(OH)D u poređenju sa nosiocima CC genotipa. Šta više, nosioci genotipa AA *DBP* rs4588 imali su najniže vrednosti vitamina D od 5.7mg/l, ukazujući da alel A predisponira za nizak nivo vitamin D. Ovo je u skladu sa rezultatima koji su prisutni u literaturi [114].

Kada se uporede grupe pacijenata i zdravih ispitanika uočava se da je genotip AA rs4588 *DBP* gena statistički značajno više prisutan kod obolelih i povećava 8 puta šansu od oboljevanja.

Kao još jedan značajan faktor koji igra ulogu protekturnog faktora za sarkoidozu pokazao se u našoj kohorti ispitanika *CYP27B1* gen. Naime, genotip CC rs10877012 *CYP27B1* gena je bio statistički značajno učestaliji u kontrolnoj grupi, dakle CC genotip ima protektivno dejstvo u smislu oboljevanja od sarkoidoze.

Ispitivanje ostalih genetičkih varijanti ukazalo je na to da ovi polimorfizmi utiču na dužinu trajanja bolesti. Naime, trajanje bolesti duže ukoliko je prisutan mutirani alel za gene *VDR* i *CYP2R1*, a kod gena *VDR* ukoliko su oba mutirana alela pristuna, trajanje bolesti je 2 puta duže.

Proučavanje međusobne povezanosti sarkoidoze, nivoa vitamina D u serumu i gena za put vitamina D može pružiti dragoceni doprinos razumevanju, kao i prevenciji i lečenju ove bolesti. Naši rezultati su istakli važne asocijacije između oboljevanja od sarkoidoze i SNV-a u genima rs10877012 *CYP27B1* i rs4588 *DBP*, kao i nivoa vitamina D u serumu i SNV-a rs4588 *DBP*, koji mogu predstavljati važne aspekte koji se trebaju uzeti u obzir u praćenju, merenju i supstituciji u lečenju pacijenata sa sarkoidozom u budućnosti. Kada se govori o efikasnosti suplementacije vitamina D u opštoj populaciji, geni *DBP* i *CYP2R1*, koji su povezani sa bazalnim nivoima 25(OH)D, nisu modifikovali odgovor na suplementaciju [115]. Suprotno tome, SNV-ovi u genima *CYP24A1* i *VDR*, koji nisu bile povezani sa bazalnim nivoima, imali su uticaj na odgovor na suplementaciju [115]. Fu i sar. otkrili su da različiti *DBP* genotipovi kod zdravih ispitanika mogu izazvati različite odgovore na istu dozu vitamina D [116].

Uprkos jasnim kliničkim koristima i efikasnom smanjenju simptoma usled dodavanja vitamina D među različitim imunološkim stanjima [48-50], lečenje pacijenata sa sarkoidozom u tom pogledu nije tako jasno. Kod pacijenata sa sarkoidozom ovaj je problem još složeniji zbog poremećaja kalcijuma, što omogućava suplementaciju i izlaganje suncu samo pacijenata sa normalnim nivoom kalcijuma u serumu ili urinu [19]. Buduće studije sarkoidoze i drugih bolesti povezanih sa vitaminom D trebalo bi da se usredsrede na bolje objašnjavanje ovih asocijacija i istraživanje uticaja drugih faktora povezanih sa SNV-ovima koji su u vezi sa vitaminom D, na prevenciju, ishode i reakciju na terapiju.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata analize SNV u genima metaboličkog puta vitamina D kod obolelih od sarkoidoze i zdravih ispitanika, moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Rezultati naše studije su pokazali da je 44% naših pacienata imalo izrazitu deficijenciju, odnosno serumski nivo vitamina 25(OH)D manji od 10 mg/l.
2. mlađi pacijenti ( $46,81 \pm 9,85$ god.) imali niže vrednosti vitamin D3 ( $< 10$  mg/l).
3. postoji statistički značajna korelacija nivoa Ca sa koncentracijom vitamin D.
4. Ispitivanje parametara plućne funkcije je pokazalo da koncentracija vitamina D značajno korelira sa DcoP.
5. pokazano je da postoji negativna statistički značajna korelacija FAS i CESd skale sa koncentracijom vitamin D.
6. *DBP* gen utiče na nivo vitamina D u smislu da su nosioci genotipa CA+AA rs4588 *DBP* gena u našoj kohorti ispitanika imali statistički značajno niži nivo serumskog 25(OH)D u poređenju sa nosiocima CC genotipa.
7. nosioci genotipa AA *DBP* rs4588 imali su najniže vrednosti vitamina D od 5.7mg/l, ukazujući da alel A predisponira za nizak nivo vitamin D.
8. genotip AA rs4588 *DBP* gena statistički značajno više prisutan kod obolelih u odnosu n kontrolnu grupu i povećava 8 puta šansu od oboljevanja.
9. genotip CC rs10877012 *CYP27B1* gena je bio statistički značajano učestaliji u kontrolnoj grupi, dakle CC genotip ima protektivno dejstvo u smislu oboljevanja od sarkoidoze. OR je pokazao da individue koje nose CC genotip imaju 10 puta manju šansu za obolevanje od sarkoidoze.
10. trajanje bolesti duže ukoliko je prisutan mutirani alel za gene *VDR* i *CYP2R1*, a kod gena *VDR* ukoliko su oba mutirana alela prisutna, trajanje bolesti je 2 puta duže.

## **7. LITERATURA**

1. Mihajlovic-Vucinic V. Sarkoidoza. Plućne bolesti, Elit Medica, Beograd. 2000:440-6.
2. Iwai K, Tachibana T, Takemura T, Matsui Y, Kitaichi M, Kawabata Y. Pathological studies on sarcoidosis autopsy. I. Epidemiological features of 320 cases in Japan. *Acta Pathol Jpn.* 1993;43(7-8):372-6.
3. Mihailovic-Vucinic V. Sarkoidoza. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu Beograd: Infohome. 2000.
4. Skodric-Trifunovic V, Vucinic V, Simic-Ogrizovic S, Stevic R, Stjepanovic M, Ilic K, et al. Mystery called sarcoidosis: forty-four years follow-up of chronic systemic disease. *Srp Arh Celok Lek.* 2012;140(11-12):768-71.
5. Rybicki B, Major M, Popovich J J, Maliarik M, Iannuzzi M. Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in a health maintenance organization. *Am J Epidemiol.* 1997;145(3):234-41.
6. Gribbin J, Hubbard R, Le Jeune I, Smith C, West J, Tata L. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax.* 2006;61(11):980-5.
7. Morimoto T, Azuma A, Abe S, Usuki J, Kudoh S, Sugisaki K, et al. Epidemiology of sarcoidosis in Japan *Eur Respir J.* 2008;31(2):372-9.
8. Judson M, Boan A, DT. L. The clinical course of sarcoidosis: presentation, diagnosis, and treatment in a large white and black cohort in the United States. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2012;29(2):119-27.
9. Park J, Kim Y, Kang M, Kim C, Han C, Lee S, et al. Prevalence, incidence, and mortality of sarcoidosis in Korea, 2003-2015: a nationwide population-based study. *Respir Med.* 2018(144S):S28-S34.
10. Arkema E, Grunewald J, Kullberg S, Eklund A, Askling J. Sarcoidosis incidence and prevalence: a nationwide register-based assessment in Sweden. *Eur Respir J.* 2016;48(6):1690-9.
11. Baughman R, Field S, Costabel U, Crystal R, Culver D, Drent M, et al. Sarcoidosis in America: analysis based on health care use. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13(8):1244-52.
12. Ungprasert P, Carmona E, Utz J, Ryu J, Crowson C, Matteson E. Epidemiology of sarcoidosis 1946-2013: a population-based study. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(2):183-8.
13. Grunewald J, Grutters J, Arkema E, Saketkoo L, Moller D, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):45.
14. Costabel U, Hunninghake G. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. *Eur Respir J.* 1999;14(4):735-7.
15. Gerke A. Morbidity and mortality in sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20:472-8.
16. Hoitsma E, Faber C, Drent M, Sharma O. Neurosarcoidosis: a clinical dilemma. *Lancet Neurol.* 2004;3(7):397-407.
17. Mirsaeidi M, Machado R, Baughman R. Racial Difference in Sarcoidosis Mortality in the United States. *Chest.* 2015;147(2):438-49.
18. Hosoda Y, Sasagawa S, Yasuda N. Epidemiology of sarcoidosis: new frontiers to explore. *Curr Opin Pulm Med.* 2002;8(5):424-8.
19. Mihailović-Vučinić V, S. I, Dudvarski-Ilić S, Stjepanović M, Vuković M, Omčikus M. The role of vitamin D in multisystem sarcoidosis. *J Med Biochem* 2012;31:339-46.
20. Carmona E, Kalra S, Ryu J. Pulmonary Sarcoidosis: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(7):946-54.
21. Gorham E, Garland C, Garland F, Kaiser K, Travis W, Centeno J. Trends and occupational associations in incidence of hospitalized pulmonary sarcoidosis and other lung diseases in Navy personnel: a 27-year historical prospective study, 1975-2001. *Chest.* 2004;126(5):1431-8.

22. Kucera G, Rybicki B, Kirkey K, Coon W, Major L, Maliarik J, et al. Occupational risk factors for sarcoidosis in African-American siblings. *Chest*. 2003;123(5):1527-35.
23. Izbicki G, Chavko R, Banauch G, Weiden M, Berger K, Aldrich T. World Trade Center "sarcoid-like" granulomatous pulmonary disease in New York City Fire Department rescue workers. *Chest*. 2007;131(2):1414-23.
24. Rybicki B, Amend K, Maliarik M, MC. I. Photocopier exposure and risk of sarcoidosis in African-American sibs. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2004;21(1):49-55.
25. Roach D, Bean A, Demangel C, France M, Briscoe H, Britton W. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*. 2002;168(9):4620-7.
26. Zissel G, Prasse A, Muller-Quernheim J. Sarcoidosis-immunopathogenetic concepts. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007;28:3-14.
27. Broos C, Van Nimwegen M, Hoogsteden H, Hendriks R, Kool M, Van denBlink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis. *Front Immunol*. 2013;4:437.
28. Rybicki B, Kirkey K, Major L, Maliarik J, Popovich J, Chase G, et al. Familial risk ratio of sarcoidosis in African-American sibs and parents. *Am J Epidemiol*. 2001;153(2):188-93.
29. Sverrild A, Backer V, Kyvik K, Kaprio J, Milman N, Svendsen C. Heredity in sarcoidosis: aregistry-basedtwin study. *Thorax*. 2008;63(10):894-6.
30. Adrianto I, Lin C, Hale J, Levin A, Datta I, Parker R, et al. Genome-wide association study of African and European Americans implicates multiple shared and ethnic specific loci in sarcoidosis susceptibility. *PLoS One*. 2013;7(8):e43907.
31. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet*. 2005;37(4):357-64.
32. Rybicki B, Walewski J, Maliarik M, Kian H, Iannuzzi M, Group AR. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet*. 2005;77(3):491-9.
33. Rossman M, Thompson B, Frederick M, Maliarik M, Iannuzzi M, Rybicki B, et al. HLA-DRB1\*1101: a significant risk factor for sarcoidosis in blacks and whites. *Am J Hum Genet*. 2003;73(4):720-35.
34. Berlin M, Fogdell-Hahn A, Olerup O, Eklund A, Grunewald J. HLA-DR predicts the prognosis in Scandinavian patients with pulmonary sarcoidosis *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(5):1601-5.
35. Sato H, Grutters J, Pantelidis P, Mizzon A, Ahmad T, vanHoute A-J. HLA-DQB1\*0201: a marker for good prognosis in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;27(4):406-12.
36. Grunewald J, Eklund A, Olerup O. Human leukocyte antigen class I alleles and the disease course in sarcoidosis patients *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(6):696-702.
37. Grunewald J, Eklund A. Lofgren's syndrome: human leukocyte antigen strongly influences the disease course. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(4):307-12.
38. Iannuzzi M, Rybicki B, Teirstein A. Sarcoidosis *N Engl J Med*. 2007;357:2153-65.
39. Mihailović-Vučinić V, Videnović-Ivanov J, Gostiljac D, Filipovic S, Marić J. Chronic sarcoidosis. *Med Pregl*. 2005;58:39-43.
40. Atmaca L, P. A-S, Idil A, Kumbasar O, Celik G. Ocular involment in sarcoidosis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2009;17(2):91-4.
41. Castagna I, Salmeri G, Fama F, Trombetta C, Ricci R, Traclo C. Optic nerve granuloma as a first sign of sarcoidosis. *Ophthalmologica*. 1994;4(4):230-2.
42. Stjepanović M. Vanplućne komplikacije plućne sarkoidoze-neurosarkoidoza: evaluacija, terapija i komplikacije zahvaćenosti nervnog sistema. *Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu*. 2013:Akademski specijalistički rad.
43. Stjepanović M, Mihailović-Vučinić V, Dudvarski-Ilić A, Videnović-Ivanov J, Škodrić-Trifunović V, Popević S. Kliničke manifestacije neurosarkoidoze. *Med Pregl*. 2013;66(Suppl 1):54-9.

44. Stjepanović M, Mihailović-Vučinić V, Jovanović D, Mijajlović M, Škodrić-Trifunović V, Videnović-Ivanov J. Radiological presentation of neurosarcoidosis. *Med Pregled*. 2014;67(1-2):24-7.
45. Bargagli E, Prasse A. Sarcoidosis: a review for the internist. *Intern Emerg Med*. 2018;13:325-31.
46. Baughman R, Teirstein A, Judson M, Rossman M, Yeager H, Bresnitz E. Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS) research group. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1885-9.
47. Coker R. Management strategies for pulmonary sarcoidosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2009;5:575-84.
48. Videnović-Ivanov J, Šobić-Šaranović D, Grozdić I, Mihailović-Vučinić V, Filipović S, Stjepanović M. Rezultati primene 18F-FDG/PET scan-a kod sarkoidoze hroničnog toka. *Med Pregl*. 2013;66(Suppl 1):50-3.
49. Soto-Gomez N, Peters J, Nambiar A. Diagnosis and Management of Sarcoidosis. *Am Fam Physician*. 2016;93(10):840-8.
50. Popević S, Bukurov-Sudić E, Uskoković-Stefanović Ž, Dudvarski-Ilić A, Stjepanović M, Vučinić V. Savremena bronhoskopska dijagnostika sarkoidoze. *Med Pregl*. 2013;66(Suppl 1):17-21.
51. Grosso S, Margollicci M, Bargagli E, QR. B, Perrone A, Galimberti D. Serum levels of chitotriosidase as a marker of disease activity and clinical stage in sarcoidosis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64:57-62.
52. Ding E, Mehta S, Fawzi W, Giovannucci E. Interaction of estrogen therapy with calcium and vitamin D supplementation on colorectal cancer risk: reanalysis of Women's Health Initiative randomized trial. *Int J Cancer*. 2008;122:1690-4.
53. Mahévas M, Lescure F, Boffa J. Renal sarcoidosis: clinical, laboratory, and histologic presentation and outcome in 47 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2009;88:98-106.
54. Holick M. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-81.
55. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: 2001 update. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1496-503.
56. Sharma O. Vitamin D and sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2010;16:487-8.
57. Sodhi A, Aldrich T. Vitamin D Supplementation: Not So Simple in Sarcoidosis. *Am J Med Sci*. 2016;352(3):252-7.
58. Baughman R, Papanikolaou I. Current concepts regarding calcium metabolism and bone health in sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2017;23(5):476-81.
59. Wang Y, Zhu J, DeLuca H. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):123-33.
60. Khammissa R, Fourie J, Motswaledi M, Ballyram R, Lemmer J, Feller L. The Biological Activities of Vitamin D and Its Receptor in Relation to Calcium and Bone Homeostasis, Cancer, Immune and Cardiovascular Systems, Skin Biology, and Oral Health. *Biomed Res Int*. 2018;2018:9276380.
61. Gezen-Ak D, Dursun E, Yilmazer S. The Effect of Vitamin D Treatment On Nerve Growth Factor (NGF) Release From Hippocampal Neurons. *Noro Psikiyatrs Ars*. 2014(251):157-62.
62. Bikle DVDaFUCPCOR. Vitamin D and Immune Function: Understanding Common Pathways. *Curr Osteoporos Rep*. 2009;7(2):58-63.
63. Nurminen V, Seuter S, Carlberg C. Primary Vitamin D Target Genes of Human Monocytes. *Front Physiol*. 2019;10:194.
64. Kang W, Lee S, Jeon E, Yun Y, Kim K, Jang J. Emerging role of vitamin D in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2011;3(8):123-7.
65. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Vitamin D, respiratory infections, and asthma. *Current allergy and asthma reports*. 2009;9(1):81-7.

66. Škodrić-Trifunović V, Buha I, Jovanović D, Vučinić V, Stjepanović. M. Variants in VDR and NRAMP1 genes as susceptibility factors for tuberculosis in the population of Serbia. *Genetika*. 2013;47(3):1021-8.
67. Culver D. Sarcoidosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2012;32:487-511.
68. Ponchon G, DeLuca H. The role of the liver in the metabolism of vitamin D. *J Clin Invest*. 1969;48:1273-9.
69. Fraser D, Kodicek E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite *Nature*. 1970;228:764-6.
70. Hewison M, Adams J. *Extrarenal 1-hydroxylase*. Academic Press. 2011:777-806.
71. Zella L, Shevde N, Hollis B, Cooke N, Pike J. Vitamin D-binding protein influences total circulating levels of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> but does not directly modulate the bioactive levels of the hormone in vivo. *Endocrinology*. 2008;149:3656 - 67.
72. Safadi F, Thornton P, Magiera H, Hollis B, Gentile M, Haddad J, et al. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest*. 1999;103:239-51.
73. Cheng J, Levine M, Bell N, Mangelsdorf D, Russell D. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:7711-5.
74. St-Arnaud R, Messerlian S, Moir J, Omdahl J, Glorieux F. The 25-hydroxyvitamin D 1-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J Bone Miner Res*. 1997;12:1552- 559.
75. Takeyama K, Kitanaka S, T. S, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*. 1997;277:1827-30.
76. Jones G, Strugnell S, DeLuca H. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev*. 1998;78:1193-231.
77. Prosser D, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci*. 2004 29:664-73.
78. Jones G, Prosser D, Kaufmann J. Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lip Res*. 2014;55:13-31.
79. Ramagopalan S, Heger A, Berlanga A, Maugeri N, Lincoln M, Burrell A, et al. A ChIP-seq-defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: Associations with disease and evolution *Genome Res*. 2010;20:1352-60
80. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour J. IOF position statement: Vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporos Int*. 2010;21:1151-4.
81. Merlino L, Curtis J, Mikuls T. Vitamin D Intake Is Inversely Associated With Rheumatoid Arthritis: Results From the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum*. 2004;50:72-7.
82. Alshahrani F, Aljohani N. Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity. *Nutrients*. 2013;5:3605-16.
83. Thacher T, Clarke B. Vitamin D Insufficiency *Mayo Clin Proc*. 2011;8686:6050.
84. Kennel K, Drake M, Hurley D. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc*. 2010(85):752-8.
85. Zehnder D, land R, Williams M, Mc R, Ninch A, Howie P, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:888-94.
86. Shinki T, Ueno Z, DeLuca H, Suda T. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 alpha-hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:8253-8.
87. Liu S, Quarles L. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1637-47.
88. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Z, Hosoy T, Kato S. The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;249:11-6.

89. Brenza H, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, et al. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D 3 1 alpha-hydroxylase gene promoter. *PNAS*. 1998;95:1387-91.
90. Adams JS, Singer F, Gacad M, Sharma O, Hayes M, Vouros P, et al. Isolation and structural identification of 1,25-dihydroxyvitamin D 3 produced by cultured alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;60:960-6.
91. Overbergh L, Stoffels K, Waer M, Verstuyf A, Bouillon R, Mathieu C. Immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase in human monocytic THP1 cells: mechanisms of interferon-gamma -mediated induction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3566- 574.
92. Esteban L, Vidal M, Dusso A. 1 alpha-Hydroxylase transactivation by gamma-interferon in murine macrophages requires enhanced C/EBPbeta expression and activation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90:131-7.
93. Nelson D. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys*. 2003;409:18-24.
94. Cheng J, Motola D, Mangelsdorf D, Russell D. De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem*. 2003;278:38084-93.
95. Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. *Front Endocrinol*. 2020;10:910.
96. White P, Cooke N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:320-7.
97. Omdahl J, Bobrovnikova E, Choe S, Dwivedi P, May B. Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway. *Steroids* 2001;66:381-9.
98. Chen C, Liu Q, Zhu L, Yang H, Lu W. Vitamin D receptor gene polymorphisms on the risk of tuberculosis, a meta-analysis of 29 case-control studies. *PloS one*. 2013;8(12):e83843.
99. Kang TJ, Jin SH, Yeum CE, Lee SB, Kim CH, Lee SH, et al. Vitamin D Receptor Gene TaqI, BsmI and FokI Polymorphisms in Korean Patients with Tuberculosis. *Immune network*. 2011;11(5):253-7.
100. Cutolo M. Vitamin D or hormone D deficiency in autoimmune rheumatic diseases, including undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(6):123.
101. Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiologic reviews*. 2000;22(2):203-17.
102. Valeyre D, Jeny F, Nunes H. Current Medical Therapy for Sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2017;38(4):523-31.
103. Baughman R, Lower E. Goldilocks, vitamin D and sarcoidosis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(3):111.
104. Burke R, Benjamin M, Rybicki A, Sudhaker Rao D. Calcium and Vitamin D in Sarcoidosis: How to Assess and Manage. *Semin Respir Crit Care Med*. 2010;31(4):474–84.
105. Harrel G, Fisher S. Blood chemical changes in Boeck's sarcoid with particular reference to protein, calcium and phosphatase values. *J Clin Invest*. 1939;18:687-93.
106. Wang T, Zhang F, Richards B, Kestenbaum B, van Meurs J, Berry D. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *The Lancet*. 2010;376(9736):180-8.
107. Nissen J, Rasmussen L, Ravn-Haren G. Common variants in CYP2R1 and GC genes predict vitamin D concentrations in healthy Danish children and adults. *PLoS One*. 2014;9(2):e89907.
108. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet*. 1993;92:183-8.
109. Abbas S, Linseisen J, Slinger T. The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:1339-43.
110. Lauridsen A, Vestergaard P, Hermann A. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 2005;77:15-22.

111. Lange C, Bojunga J, Ramos-Lopez E, von Wagner M, Hassler A. Vitamin D deficiency and CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alfa based therapy. *J Hepatol.* 2011;54:887-93.
112. Kitanaka S, Isojima T, Takak iM, Numakura C, Hayasaka K. Association of vitamin-D related gene polymorphisms with manifestations of vitamin D deficiency in children. *Endocr J.* 2012;59:1007-14.
113. van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu D, Ferreira G, et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol.* 2007;37:395-405.
114. Jolliffe D, Walton R, Griffiths C, Martineau A. Single nucleotide polymorphisms in the vitamin D pathway associating with circulating concentrations of vitamin D metabolites and non-skeletal health outcomes: review of genetic association studies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;164:18-29.
115. Fu L, Yun F, Oczak M. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clin Biochem.* 2009;42:1174-7.
116. Barry E, Rees J, Peacock J. Genetic variants in CYP2R1, CYP24A1, and VDR modify the efficacy of vitamin D3 supplementation for increasing serum 25-hydroxyvitamin D levels in a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E2133-E7.



## BIOGRAFIJA

Dr Mihailo Stjepanović, rođen je 03.08.1980. Medicinski fakultet je završio u Beogradu dana 24.06.2008. Specijalističke akademske studije, uža naučna oblast pulmologija, na Medicinskom fakultetu u Beogradu završio dana 25.01.2013, odbranivši rad pod nazivom: „Vanplućne komplikacije plućne sarkoidoze-neurosarkoidoza: evaluacija, terapija i komplikacije zahvaćenosti nervnog sistema“. Specijalizaciju iz interne medicine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, započeo aprila 2012 godine, u trajanju od 5 godina, a specijalistički ispit položio dana 24.01.2017. godine sa ocenom odličan (5). Upisao subspecijalizaciju iz pulmologije školske godine 2017/18, položio usmeni subspecijalistički ispit sa ocenom deset (10). Školske godine 2012/13 upisao doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, interna medicina, uža naučna oblast pulmologija, položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00. Zaposlen kao lekar specijalista interne medicine u Kliničkom centru Srbije, Klinika za pulmologiju, od 2009 godine, na V kliničkom odeljenju kao i Šef kabineta za naučno istraživački rad i edukaciju. Izabran u zvanje kliničkog asistenta na predmetu interna medicina na Medicinskom fakultetu u Beogradu od 01.03.2018.

Autor je i ko-autor u više poglavlja udžbenika, knjiga,sto šezdeset stručnih radova i publikacija, od kojih je dvadeset radova in extenso u časopisima indeksiranim u CC/SCI bazi.

Oženjen, otac troje dece.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Михаило Стојераковић

Број индекса PL-01/12

### Изјављујем

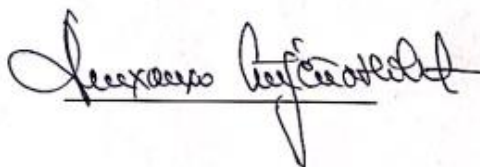
да је докторска дисертација под насловом

"УЛОГА И ДИФЕРЕНЦИЈА СЕРУМСКОГ ВИТАМИНА 25(OH)D I ПОЛИМОРФНИ БЕТА СФЕРРИН, СФЕРРИН, DBP I VDR КОД ОБОЛЕЛИХ ОД САРКОИДОЗЕ"

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

у Београду, 18.05.2020



**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора MIRALDO STJEPANOVIC

Број индекса PL-01 / 12

Студијски програм PULMOLOGIJA

Наслов рада ZNASAJ O MEDIKACIJA SEUMALOB VITAMINA 25(OH)D I POLIMORFNI BETA CYP28A

Ментор PROF. DR. VIOLETA KUKUNIC-KUCINIC

CYP 27B1, D BP I UOR KOD OBOLELANJA OD SPREKOIDNE

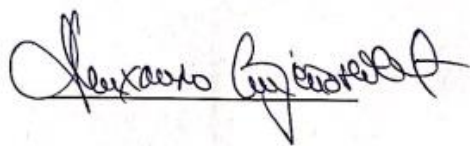
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 18.05.2010



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„УПАСАЈ СИНТЕТИЧКИХ ХЕЛУИНСКИХ УСТАНИЦА 25(OH)D<sub>3</sub> И ПОСМОРФИНИ БЕТА СФЕРИЛ, СФЕРИЛ, ДБР И ВДВ КОД БОЛЕЉА ОД САРКОМОZE“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе 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 прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, 18.05.2020

Потпис аутора

