

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ

Белетић Д. Анђело

**УТИЦАЈ НАСЛЕДНИХ И СТЕЧЕНИХ  
ФАКТОРА НА НИВО ХОМОЦИСТЕИНА У  
КРВИ БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНОМ  
ОПСТРУКТИВНОМ БОЛЕШЋУ ПЛУЋА**

докторска дисертација

Београд, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Beletić D. Anđelo

**INFLUENCE OF INHERITED AND  
ACQUIRED FACTORS ON  
HOMOCYSTEINE BLOOD LEVEL IN  
PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE  
PULMONARY DISEASE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Ментор: Др Душко Мирковић, ванредни професор  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

Чланови комисије:

1. Др Душко Мирковић, ванредни професор  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
2. Др Нада Мајкић-Singh, редовни професор у пензији  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
3. Др Светлана Игњатовић, редовни професор  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
4. Др Валентина Ђорђевић, научни сарадник  
Универзитет у Београду - Институт за молекуларну генетику и генетичко  
инжењерство
5. Др Александра Дудварски-Илић, доцент  
Универзитет у Београду - Медицински факултет

Датум одбране: \_\_\_\_\_

## ЗАХВАЛНИЦА

Ментору, Проф. Др Душку Мирковићу, захваљујем на поверењу, помоћи и подршци током израде дисертације, као и на несебично пренешеном знању за време студија на Фармацеутском факултету и током рада у Служби за ургентну лабораторијску дијагностику.

Посебну захвалност упућујем мом првом и дугогодишњем Учитељу, Проф. Др Нади Мајкић-Singh, која ми је својим непроцењивим ангажовањем и искреним разумевањем помогла и у овом делу професионалног развоја.

Проф. Др Светлани Игњатовић захваљујем на помоћи и саветима у експерименталном раду и писању дисертације.

Професионална помоћ, сугестије, и надасве безгранична подршка Др Валентине Ђорђевић, научног сарадника, били су драгоцени за успешан завршетак дисертације.

Доц. Др Александри Дудварски-Илић дугујем захвалност на вољи и стрпљењу да ми помогне да савладам клиничке аспекте дисертације.

На помоћи око сакупљања узорака и података о болесницима и здравим испитаницима захваљујем се и Проф. Др Бранислави Миленковић и Проф. Др Људмили Нагорни-Обрадовић са Клинике за пулмологију Клиничког центра Србије, као и Асист. Др Небојши Антонијевићу са Клинике за кардиологију Клиничког центра Србије. Др Драгици Радојковић, научном саветнику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду и Др Небојши Довезенском из фирме LKB Vertriebs GmbH се захваљујем на могућности да овладам молекуларним методама коришћеним у експерименталном раду, а Др Мили Љујић, научном сараднику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, на помоћи око примене методе секвенцирања ДНК.

# УТИЦАЈ НАСЛЕДНИХ И СТЕЧЕНИХ ФАКТОРА НА НИВО ХОМОЦИСТЕИНА У КРВИ БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНОМ ОПСТРУКТИВНОМ БОЛЕШЋУ ПЛУЋА

## Резиме

Хомоцистеин (Нсу) је непротеинска аминокиселина, која се ствара током метаболизма метионина и катаболише транссулфурацијом до цистеина или реметилује до метионина. Генетски узроци благе хиперхомоцистеиније (ННсу) се могу приписати полиморфизмима у гену за метилентетрахидрофолат редуктазу (МТНFR) - С677Т и А1298С, док су недостатак фолата и витамина Б12 најчешћи стечени фактори. Хронична обструктивна болест плућа (ХОБП) је мултифакторско обољење, са глобалном учесталашћу од 6%, при чему се процењује да годишње умре око 3 милиона оболелих.

Главни разлог за истраживање повезаности ННсу и ХОБП је чињеница да је ННсу укључена у патогенезу скоро свих коморбидитета ХОБП: кардиоваскуларних болести, мишићне дисфункције, остеопорозе, депресије, канцера плућа итд. Међу предикторима концентрације Нсу чији су ефекти испитивани код оболелих од ХОБП, за концентрације фолата и витамина Б12 је показано да имају значајан ефекат, док то није био случај са старошћу и бубрежном функцијом. Разлике по полу као и корелација са концентрацијом CRP су тестиране, међутим резултати су били неусаглашени. Осим тога, у тренутно доступној литератури нема података о повезаности полиморфизама у гену за МТНFR и ННсу код болесника са ХОБП.

Основни циљ истраживања је био да се у групи болесника са ХОБП одреде ниво Нсу и инциденца ННсу, односно да се процени како на њих утичу пол, старост, полиморфизама МТНFR (С677Т и А1298С) и концентрација фолата и витамина Б12, као и да се процени да ли појава ННсу може представљати биомаркер дефицијенције поменутих витамина. Истраживање је за додатне циљеве имало да испита повезаност нивоа Нсу, односно инциденце

ННсу са присуством дефицијенције алфа-1-антитрипсина (ААТД), до сада најбоље описаним генетским фактором ризика за ХОБП, као и концентрацијом CRP, маркером инфламације код оболелих. Такође, циљ је био и да се процени заједнички утицај испитиваних фактора на ниво Нсу и инциденцу ННсу код болесника са ХОБП. У ширем контексту повезаности ННсу и тромбофилије, циљеви су обухватили и испитивање учесталости мутација FV Leiden и FII G20210A у истој групи болесника.

Опсервационо "case-control" истраживање је укључило 50 болесника (49,0±14,5 година) којима је ХОБП дијагностикована пре 45. године живота и контролну групу од 48 здравих особа (47,2±9,7 година). Концентрације Нсу, фолата и витамина Б12 су одређиване хемилуминисцентним имуноодређивањем на микро честицама (СМИА), а ниво CRP имунонефелометријски. ННсу је дефинисана као концентрација Нсу изнад 12  $\mu\text{mol/L}$ . За анализу генских варијанти MTHFR C677T и A1298C, односно FV Leiden и FII G20210A, коришћена је метода заснована на реакцији ланчаног умножавања полимеразом (PCR) и реверзној хибридацији са алел-специфичним олигонуклеотидима (rASO). Присуство ААТД је испитивано применом интегративног алгорита који укључује имунонефелометријску анализу, PCR-rASO, изоелектрично фокусирање и секвенцирање ДНК. Расподела вредности континуираних варијабли је тестирана Shapiro-Wilk тестом и у зависности од резултата вредности су изражене као медијане са интерквартилним односно распоном између минималних и максималних вредности, или као средње вредности са стандардном девијацијом. За испитиване факторе израчунаван је odds ratio (OR) са интервалом поузданости од 95% (95% CI). У статистичкој анализи резултата примењени су Студент t, Kruskal-Wallis и Mann-Whitney U тест, без и са Boniferroni корекције, односно тестови Chi-square, Fisher exact и McNemar Chi-square with exact P модулом, Spearman-ова непараметарска корелација, мултипла и логистичка регресиона анализа, као и Receiver Operating Characteristic (ROC) анализа.

Ниво Нсу код болесника 13,22 (11,31–16,08)  $\mu\text{mol/L}$  је био већи ( $P < 0,001$ ) у односу на вредност код контролне групе 9,80 (8,55–11,92)  $\mu\text{mol/L}$ . Инциденца

ННсу међу оболелима је била за 47% већа него међу испитаницима у контролној групи, што је такође представљало значајну разлику ( $P < 0,001$ ). OR од 3,889 (1,677–9,017) је указао да је ХОБП значајан фактор ризика за појаву ННсу ( $P = 0,002$ ).

Пол и старост нису утицали на ниво Нсу и инциденцу ННсу код испитиваних болесника. Мушки болесници су имали веће концентрације Нсу ( $P = 0,019$ ) и учесталост ННсу ( $P = 0,019$ ) у односу на здраве мушкарце. Аналогне разлике су уочене и међу испитаницама, како у погледу концентрације Нсу ( $P = 0,003$ ), тако и по инциденци ННсу ( $P < 0,001$ ). Фреквенција МТНFR 677 Т алела код испитиване групе болесника је била 37,8%, док је МТНFR 1298 С алел био присутан код 30,0% оболелих. Повећана концентрација Нсу је уочена код болесника са МТНFR 677 ТТ генотипом, док се МТНFR 1298 С алелом није могао повезати са разликама у нивоу Нсу. Такође присуство поменутих алела није доводило до повећане учесталости ННсу. Ниво Нсу код болесника није био повезан са концентрацијом фолата, али је показао значајну негативну корелацију са нивоом витамина Б12 ( $\rho_s = -0,310$ ,  $P = 0,029$ ). Појава ННсу није била поуздан маркер дефицита поменутих витамина у испитиваној групи оболелих. Присуство ААТD није повезано са повишеном концентрацијом Нсу и инциденцом ННсу. Међутим, уочен је тренд присуства виших концентрација Нсу код болесника који су носиоци ретких алела SERPINA1 гена. Концентрација CRP је била значајно већа код болесника него у контролној групи ( $P = 0,032$ ), међутим није била у корелацији са нивоом Нсу ни код оболелих ( $\rho_s = -0,046$ ,  $P = 0,749$ ) ни код здравих испитаника ( $\rho_s = -0,034$ ,  $P = 0,818$ ).

Присуство ХОБП је у подједнакој мери повећавао ризик од настанка ННсу код особа различитог пола и старости, а такође је уочено да ризик не зависи од присуства МТНFR 677 Т алела односно повишених вредности CRP. Заједнички утицај испитиваних фактора је био одговоран за приближно 64,7% варијације у нивоу Нсу код болесника у студији. Значајне предикторе концентрације Нсу су представљали МТНFR 677 ТТ генотип (у просеку доводи до пораста концентрације Нсу за 9,037  $\mu\text{mol/L}$ ), концентрација витамина Б12 (пораст од 1 ng/L доводи до просечног снижења концентрације Нсу за 0,007

$\mu\text{mol/L}$ ) и присуство ААТД (повезује са просечним порастом концентрације Нсу од  $9,558 \mu\text{mol/L}$ ). Међутим, једино је недостатак витамина Б12 представљао фактор ризика за настанак ННсу код испитиваних болесника ( $P=0,028$ ), у смислу да његово присуство повећава вероватноћу за настанак ННсу око 14 пута.

Резултати истраживања су потврдили значајну повезаност ХОБП и поремећаја у метаболизму Нсу. Посматрани појединачно, једино присуство МТНFR 677 ТТ генотипа и концентрација витамина Б12 показују значајан утицај на ниво Нсу код испитиваних болесника. Заједнички утицај испитиваних фактора је одговоран за приближно 65% варијације у нивоу Нсу у испитиваној групи оболелих, а као значајни предиктори су идентификовани присуство МТНFR 677 ТТ генотипа, концентрација витамина Б12 и присуство ААТД. Међу испитиваним факторима дефицијенција витамина Б12, дефинисана као серумска концентрација мања од  $473 \text{ ng/L}$ , приближно је 14 пута повећавала ризик од настанка ННсу у испитиваној групи болесника са ХОБП.

Кључне речи: хомоцистеин, хронична опструктивна болест плућа, МТНFR, фолат, витамин Б<sub>12</sub>, дефицијенција алфа-1-антитрипсина, CRP

Научна област: Медицинске науке-Фармација

Ужа научна област: Медицинска биохемија

УДК број: 577.2 : 577.1.386 : 616.24 (043.3)

577.1 : 577.164.1 (043.3)



# INFLUENCE OF INHERITED AND ACQUIRED FACTORS ON HOMOCYSTEINE BLOOD LEVEL IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

## Summary

Homocysteine (Hcy) is a non-protein aminoacid, formed in methionine metabolism and catabolized via transsulphuration to cysteine or remethylated to methionine. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia (HHcy) can be attributed to the polymorphisms in the gene for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) - C677T и A1298C, while the deficiency of folate and vitamin B12 are the major acquired causes. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a multifactorial disease, with the global incidence of 6% and estimation that 3 million affected patients die annually.

The main rationale to investigate the association between HHcy and COPD is the involvement of HHcy in pathogenesis of almost all diseases which can coexist with COPD: cardiovascular disease, muscle dysfunction, osteoporosis, depression and lung cancer etc. Among the determinants of Hcy concentration with the effects investigated in COPD patients, folate and vitamin B12 concentrations were shown to have significant effect, while that was the case for age and renal function. Gender related differences as well as the correlation with CRP concentration were tested, but the results were inconsistent. Moreover, in the currently available literature there are no data about relationship between MTHFR polymorphisms and HHcy in COPD patients.

The main objective of the study was to determine the Hcy level and HHcy incidence in the group of COPD patients, to assess whether these variables are influenced by gender, age, MTHFR (C677T and A1298C) polymorphisms and concentrations of folate and vitamin B12, as well as to evaluate if HHcy occurrence can represent the biomarker of vitamin deficiency. Additionally the study aimed to evaluate the association of Hcy level and HHcy incidence with alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD), currently best described genetic risk factor for COPD, and CRP

level, the inflammation biomarker in COPD patients. Also the combined impact of the investigated factors was assessed. In a broader context of association between HHcy and thrombophilia, the aims of the study included the determination of the F V Leiden and F II G20210A mutations' frequencies in the same group of patients.

Observational "case-control study" included 50 patients (49.0±14.5 years) diagnosed with COPD before the age of 45 and a control group of 48 healthy persons (47.2±9.7 years). Concentrations of Hcy, folate and vitamin B12 were determined using chemiluminescent microparticle immunoassays (CMIA), while immunonephelometry was applied for CRP level. HHcy was defined as the Hcy concentration above 12 µmol/L. Analyses of genetic variants MTHFR C677T, MTHFR A1298C, F V Leiden, F II G20210A were performed using a method based on amplification with polymerase chain reaction (PCR) and reverse hybridization with allele-specific oligonucleotides (rASO). The AATD was detected with an integrative algorithm which included immunonephelometry, PCR-rASO, isoelectric focussing and DNA sequencing. Distribution of continuous variables was tested with the Shapiro-Wilk test and depending on the result expressed as median with interquartile/ minimum-maximum range, or as mean with standard deviation. For the investigated factors odds ratio (OR) with the 95% confidence interval (95% CI) was calculated. Statistical analysis included Student t, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test, with and without Boniferroni correction, Chi-square, Fisher exact and McNemar Chi-square with exact P, Spearman's correlation, multiple and logistic regression analysis, as well as Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis.

Hcy concentration in patients 13.22 (11.31–16.08) µmol/L was higher (P<0.001) in comparison with the control group 9.80 (8.55–11.92) µmol/L. HHcy incidence in the investigated patients was for 47% higher than in healthy participants, thus representing another significant difference (P<0.001). OR of 3.889 (1.677–9.017) indicated that COPD was significant risk factor for the HHcy occurrence (P=0.002).

Gender and age showed no impact on Hcy level and HHcy incidence in the investigated patients. Male patients had higher Hcy concentrations (P=0.019) and HHcy incidence (P=0.019) than healthy men. Similar differences were observed among female participants, regarding both concentration (P=0.003) and incidence

( $P < 0.001$ ). The frequency of MTHFR 677 T allele in the investigated group of patients was 37.8%, while the MTHFR 1298 C allele was present in the 30.0% of patients included in the study. Increased Hcy concentration was observed in patients with MTHFR 677 TT genotype, while MTHFR 1298 C allele could not be associated with the differences in Hcy level. Also, the presence of the mentioned alleles was not responsible for the increased HHcy incidence. Hcy concentration was not associated with the folate concentration, but the significant negative correlation with the vitamin B12 concentration was encountered ( $\rho_s = -0.310$ ,  $P = 0.029$ ). HHcy occurrence was not a reliable marker of the vitamins' deficiencies in the investigated groups of patients. AATD presence was not associated with the increased Hcy level and HHcy incidence. Nevertheless, a trend of higher Hcy concentrations was observed in the patients who were carriers of the SERPINA1 rare alleles. Although CRP concentration was higher in patients than in controls ( $P = 0.032$ ) it could not be correlated with Hcy level in patients ( $\rho_s = -0.046$ ,  $P = 0.749$ ) and healthy participants ( $\rho_s = -0.034$ ,  $P = 0.818$ ).

The presence of COPD equally increased risk for HHcy development in subjects with different gender and age, and it was also observed that the risk is not influenced by the presence of the MTHFR 677 T allele and increased CRP concentrations. Joint influence of the investigated factors was found responsible for the 64.7% of variation in the Hcy levels measured in the enrolled patients. Significant predictors of Hcy level were MTHFR 677 TT genotype (associated with the average increase of 9.037  $\mu\text{mol/L}$ ), concentration of vitamin B12 (increase of 1 ng/L causes average decrease of 0.007  $\mu\text{mol/L}$ ) and the presence of AATD (associated with the average increase in Hcy concentration of 9.558  $\mu\text{mol/L}$ ). However, only the vitamin B12 deficiency, defined as the concentration below 473 ng/L, represented a risk factor for the development of HHcy in the investigated patients ( $P = 0.028$ ), in the sense that if it was present the probability for the HHcy occurrence was increased 14 times.

Results of the study confirmed significant association between COPD and disturbance in the Hcy metabolism. Regarded individually, only the presence of the MTHFR 677 TT genotype and vitamin B12 concentration showed significant impact

on the Hcy level in the investigated patients. Joint influence of the investigated factors was responsible for the approximately 65% of variation in the Hcy levels measured in the enrolled patients. As the significant predictors were identified presence of the MTHFR 677 TT genotype, vitamin B12 concentration and AATD presence. Among the investigated factors, the deficiency of the vitamin B12 14 times increased the risk of the HHcy development in the investigated group of patients with COPD.

Keywords: homocysteine, chronic obstructive pulmonary disease, MTHFR, folate, vitamin B<sub>12</sub>, alpha-1-antitrypsin deficiency, CRP

Scientific field: Medical Sciences-Pharmacy

Subfield: Medical Biochemistry

UDC number: 577.2 : 577.1.386 : 616.24 (043.3)

577.1 : 577.164.1 (043.3)

Скраћенице:

Hcy - хомоцистеин

$K_m$  - константа Mihaelis-a и Menten-ове

Met - метионин

MAT - метионин аденозилтрансфераза (EC 2.5.1.6)

BHMT - бетаин-хомоцистеин S-метилтрансфераза (EC 2.1.1.5)

MS - метионин синтаза (EC 2.1.1.13)

MTHFR - 5,10-метилентетраhydrofolat редуктаза (EC 1.5.1.20)

PEMT - фосфатидилетаноламин N-метилтрансфераза (EC 2.1.1.17)

GAMT - гванидиноацетат N-метилтрансфераза (EC 2.1.1.2)

GNMT - глицин N-метилтрансфераза (EC 2.1.1.20)

AHH - S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе (EC 3.3.1.1)

CBS - цистатионин- $\beta$ -синтаза (EC 4.2.1.22)

CSE - цистатионин  $\gamma$ -лигаза (EC 4.4.1.1)

HHcy - хиперхомоцистеинемија

PON1 - параоксоназа 1 (EC 3.1.8.1)

HDL - липопротеини велике густине

LDL - липопротеини мале густине

SOD - супероксид дисмутаза (EC 1.15.1.1)

GPx - глутатион пероксидаза (EC 1.11.1.9)

NADPH - никотинамид аденин динуклеотид фосфат

HPLC - течна хроматографија високе ефикасности

EC - електрохемијска детекција

LC-MS-MS - течна хроматографија са двојном спектрометријом маса

GC-MS - гасна хроматографија са спектрометријом маса

FPIA - Флуоресцентно поларизационо имуноодређивање

MEIA - Ензимско имуноодређивање на микрочестицама

CMIA - Хемилуминисцентно имуноодређивање на микро честицама

ECLIA - Електро-хемилуминисцентно имуноодређивање

ХОБП - Хронична опструктивна болест плућа

NF- $\kappa$ B - нуклеарни фактор  $\kappa$ B

AATD - дефицијенција алфа-1-антитрипсина

AAT - алфа-1-антитрипсин

CYP - цитохром

FEV<sub>1</sub> - форсирани експиријумски волумен у првој секунди

FVC - форсирани витални капацитет плућа

CRP - Ц реактивни протеин

F V - V фактор коагулације (проакцелерин)

F II - II фактор коагулације (протромбин)

PCR - реакција ланчаног умножавања полимеразом

ASO - алел специфични ологонуклеотиди

ИЕФ - Изоелектрично фокусирање

$\bar{x}$  - средња вредност

SD - стандардна девијација

IQR - интерквартилни распон

OR - Odds ratio

CI - интервал поузданости (confidence interval)

$\rho_s$  - Spearman-ов коефицијент корелације

ROC анализа - Receiver Operating Characteristic анализа

AUC - површина испод криве (area under the curve) при ROC анализи

SE - стандардна грешка

B - нестандардизовани коефицијент у мултиплој регресионој анализи

$\beta$  - стандардизовани коефицијент у мултиплој регресионој анализи

# Садржај

1. УВОД.....	3
1. 1. ХОМОЦИСТЕИН.....	3
1. 1. 1. Метаболизам хомоцистеина.....	3
1. 1. 2. Хомоцистеин у крви .....	6
1. 1. 3. Хиперхомоцистеинемиа - подела и узроци.....	7
1. 1. 4. Механизми штетног деловања хиперхомоцистеинемиае .....	9
1. 1. 5. Клинички значај хиперхомоцистеинемиае.....	12
1. 1. 6. Одређивање концентрације хомоцистеина .....	15
1. 2. ХРОНИЧНА ОПСТРУКТИВНА БОЛЕСТ ПЛУЋА (ХОБП) .....	17
1. 2. 1. Епидемиологија и узроци .....	18
1. 2. 2. Патофизиолошки механизми.....	20
1. 2. 3. Дијагностиковање, ток и лечење.....	23
1. 3. ЗНАЧАЈ ИСПИТИВАЊА МЕТАБОЛИЗМА ХОМОЦИСТЕИНА КОД БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНОМ ОБСТРУКТИВНОМ БОЛЕШЋУ ПЛУЋА.....	26
2. ЦИЉЕВИ .....	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	31
3. 1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ .....	31
3. 2. ИЗБОР ИСПИТАНИКА .....	31
3. 3. ПРЕАНАЛИТИЧКА ОБРАДА УЗОРАКА.....	32
3. 4. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ХОМОЦИСТЕИНА .....	33
3. 5. АНАЛИЗА ГЕНСКИХ ВАРИЈАНТИ МТНFR С677Т, МТНFR А1298С, FV Leiden (G1691A) и FII G20210А .....	33
3. 6. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ФОЛАТА.....	35
3. 7. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ВИТАМИНА Б <sub>12</sub> .....	36
3. 8. ИСПИТИВАЊЕ ПРИСУСТВА ААТD .....	37
3. 8. 1. Одређивање концентрације ААТ.....	38
3. 8. 2. Молекуларна анализа присуства Z и S алела .....	38

3. 8. 3. Фенотипизација ААТ .....	39
3. 8. 4. Секвенцирање SERPINA1 гена .....	40
3. 9. ОДРЕЂИВАЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ CRP .....	41
3. 10. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАКА .....	41
4. РЕЗУЛТАТИ.....	42
4. 1. КОНЦЕНТРАЦИЈА НСУ И УЧЕСТАЛОСТ ННСУ.....	42
4. 2. УТИЦАЈ ПОЛА.....	45
4. 3. УТИЦАЈ СТАРОСТИ.....	47
4.4. УЧЕСТАЛОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА МТНFR С677Т И А1298С И УТИЦАЈ НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ НСУ .....	49
4.5. УТИЦАЈ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ФОЛАТА И ВИТАМИНА Б <sub>12</sub> .....	53
4.6. ПОВЕЗАНОСТ СА ААТD .....	61
4.7. ПОВЕЗАНОСТ СА КОНЦЕНТРАЦИЈОМ CRP .....	66
4.8. ЗАЈЕДНИЧКИ УТИЦАЈ ИСПИТИВАНИХ ФАКТОРА .....	68
4.9. УЧЕСТАЛОСТ МУТАЦИЈА FV LEIDEN И FII G20210A .....	70
5. ДИСКУСИЈА.....	73
5. 1. КОНЦЕНТРАЦИЈА НСУ И УЧЕСТАЛОСТ ННСУ.....	73
5. 2. УТИЦАЈ ПОЛА.....	77
5. 3. УТИЦАЈ СТАРОСТИ.....	78
5. 4. УТИЦАЈ ПОЛИМОРФИЗАМА МТНFR С677Т И А1298С.....	79
5. 5. УТИЦАЈ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ФОЛАТА И ВИТАМИНА Б <sub>12</sub> .....	81
5. 6. ПОВЕЗАНОСТ СА ААТD.....	84
5. 7. ПОВЕЗАНОСТ СА КОНЦЕНТРАЦИЈОМ CRP .....	86
5. 8. ЗАЈЕДНИЧКИ УТИЦАЈ ИСПИТИВАНИХ ФАКТОРА .....	87
5.9. УЧЕСТАЛОСТ МУТАЦИЈА FV LEIDEN И FII G20210A .....	89
5. 10. ОГРАНИЧЕЊА СТУДИЈЕ И СМЕРНИЦЕ ЗА ДАЉА ИСТРАЖИВАЊА.....	90
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	91
7. ЛИТЕРАТУРА.....	93

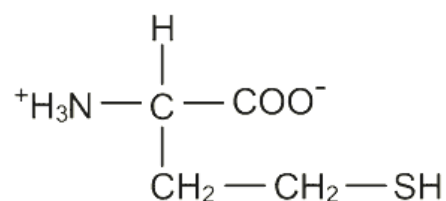


# 1. Увод

## 1. 1. Хомоцистеин

### 1. 1. 1. Метаболизам хомоцистеина

Хомоцистеин (Hcy) односно 2-амино-4 сулфанил бутанску киселину (Слика 1) први пут је описао Vincent du Vigneaud 1931. године.

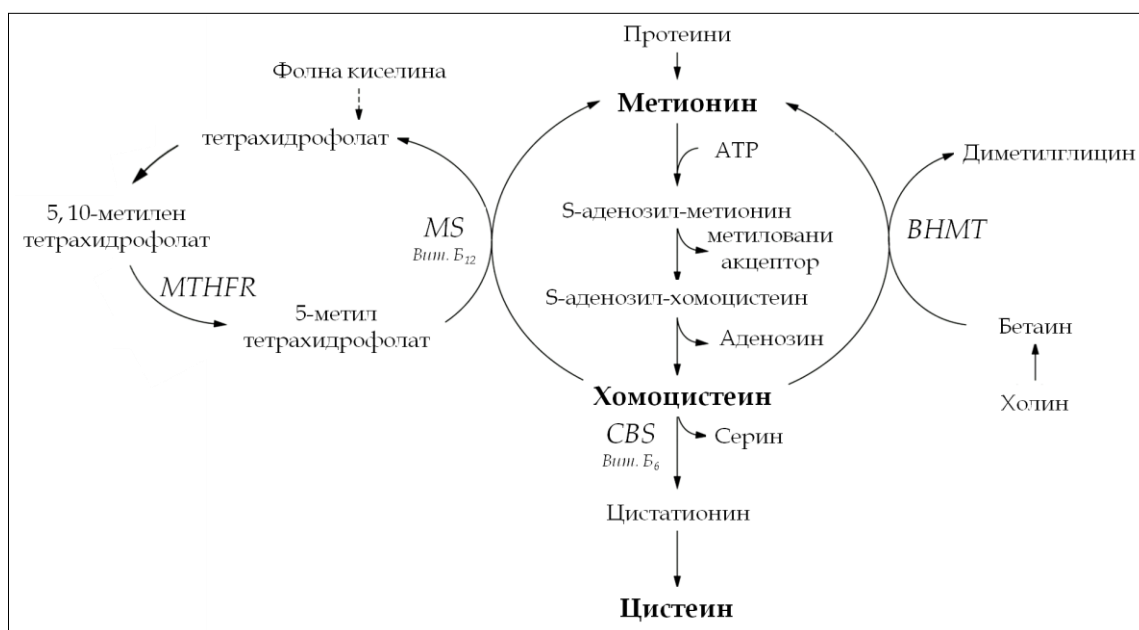


Слика 1. Хемијска структура хомоцистеина (преузето са [www.wiley.com](http://www.wiley.com)).

Заједно са цистеином и глутатионом ова сулфхидрилна аминокиселина сачињава групу аминокиселина тиолних једињења присутних код сисара. Са биолошког аспекта значајне су следеће особине тиолне групе у молекулу Hcy: рK<sub>a</sub> вредност ≈ 10, редокс потенцијал у опсегу од -0,4 до -0,2 V, капацитет за формирање слободних радикала и реактивност према карбонилној одн. карбоксилној групи (1, 2).

Hcy не учествује у биосинтези протеина, већ је у биохемијском смислу значајан као интермедијер у метаболизму метионина (Met) (2). Извесна количина ове есенцијалне аминокиселине се деловањем метионин аденозилтрансферазе (EC 2.5.1.6) (MAT) преводи у S-аденозил-Met (Слика 2). Поменути ензим се јавља у три изоформе, од којих се две (I и III) карактеристичне за хепатоците, активирају производом реакције и имају значајно више K<sub>m</sub> у односу на изоформу II, која се налази у осталим ткивима, према којој производ реакције показује инхибиторно дејство. На

овај начин се постиже да хепатоцити позитивно одговоре на повећан садржај Met у циркулацији, и да се спречи нагомилавање S-аденозил-Met у екстрахепатичким ткивима.



Слика 2. Биохемијски значај хомоцистеина  
(преведено са [www.totalpict.com/folic acid and b12 vitamin](http://www.totalpict.com/folic acid and b12 vitamin))

На Слици 2 показано је да у следећој реакцији, катализованој метилтрансферазама, S-аденозил-Met предаје метил групу акцептору и прелази у S-аденозил-Hcy. Зависно од врсте акцептора одн. метилтрансферазе, у реакцији могу настати креатин, извесни неуротрансмитери, фосфатидилхолин и друга једињења, а метил групе се могу "искористити" за метилацију ДНК, РНК, протеина итд. Најзначајније метил трансферазе, у смислу стварања највећих количина метилованих акцептора, представљају фосфатидилетаноламин N-метилтрансфераза (EC 2.1.1.17) (PEMT) и гванидиноацетат N-метилтрансфераза (EC 2.1.1.2) (GAMT), а глицин N-метилтрансфераза (EC 2.1.1.20) (GNMT) има запажену улогу у регулацији метаболизма Hcy (4). У последњем кораку из

S-аденозил-Hcy настаје Hcy деловањем S-аденозил-L-хомоцистеин хидролазе (EC 3.3.1.1) (АНН).

Као што је илустровано на Слици 2, метаболичка "судбина" насталог Hcy одређена је компетицијом између три метаболичка пута, два реметилациона и транссулфурационог. У реметилационим путевима учествују бетаин-хомоцистеин S-метилтрансфераза (EC 2.1.1.5) (BHMT) и метионин синтаза (EC 2.1.1.13) (MS). BHMT користи бетаин као извор метил групе. Деловање MS је зависно од расположивости донора метил остатка, 5-метил тетраhydrofolата, који настаје деловањем 5, 10-метилентетраhydrofolат редуктазе (EC 1.5.1.20) (MTHFR) на 5, 10-метилен тетраhydrofolат, и витамина B12, који има улогу кофактора (2, 3). Транссулфурација која Hcy преводи до цистеина, односно сулфата и таурина који се излучују урином, зависи од присуства витамина B6, коензима цистатионин- $\beta$ -синтазе (EC 4.2.1.22) (CBS) и цистатионин  $\gamma$ -лигазе (EC 4.4.1.1) (CSE), најзначајнијих ензима овог пута (5).

Ензими који учествују у метаболизму Hcy су различито распоређени по органима. У јетри делују ензими укључени у све описане путеве, MAT II, BHMT, MS, GNMT, CBS и CSE су присутни у бубрезима, а активност MAT II и CBS постоји у свим ћелијама сисара. Транссулфурациони пут се осим у јетри и бубрезима може одвијати и у танком цреву и панкреасу. Услед одсуства CBS сав Hcy створен у срцу, плућима, тестисима, надбубрежној жлезди и слезини улази у процес реметилације (2, 3, 6).

Регулација метаболизма хомоцистеина одсликава равнотежу између циклуса ресинтезе Met и транссулфурационог пута, која се успоставља захваљујући различитом афинитету ензима за Hcy као и алостерним ефектима интермедијера (2). Значајно нижа  $K_m$  вредност за Hcy код BHMT (0,012–0,06 mmol/L) одн. MS (0,06 mmol/L) у односу на вредност коју има CBS (1–25 mmol/L) указује да је реметилациони пут доминантан одн. да се тек након засићења његових капацитета активира транссулфурациони (2,

6). Алостерне ефекте показују S-аденозил-Met, S-аденозил-Hcy и 5-метилтетрахидрофолат. CBS се активира, а BHMT и MTHFR инхибирају под утицајем S-аденозил-Met док S-аденозил-Hcy показује супротне ефекте на њихову активности. GNMT се инхибира дејством 5-метилтетрахидрофолата и на тај начин успорава превођење S-аденозил-Met у S-аденозил-Hcy. Алостерни механизми омогућавају да S-аденозил-Met буде "индикатор" концентрације Met односно трансметилационог потенцијала у ћелији чији ће пораст у случају појаве вишка Met активирати транссулфурациони пут његове елиминације из организма, а у супротном активирати путеве ресинтезе (3–5).

### 1. 1. 2. Хомоцистеин у крви

У људском организму постоје различити облици Hcy: слободан, хомоцистин, Hcy-цистеин, S-аденозил-Hcy, Hcy-тионолактон као и Hcy везан за протеине формирањем дисулфидних веза односно амида са слободним амино групама у бочним ланцима аминокиселина (N-Hcy-протеини). Када је равнотежа у метаболизму Hcy очувана, фракција дисулфидно везана за протеине (највећим делом албумин) представља приближно 80% од укупне количине Hcy присутне у плазми, хомоцистин и Hcy-цистеин заједно 19% и слободни хомоцистеин око 1%, а количине осталих облика су занемарљиве. Када је равнотежа нарушена, јавља се пораст концентрација S-аденозил-Hcy, Hcy-тионолактона и N-Hcy-протеина (2, 7).

Вредности интра- и интериндивидуалних коефицијената варијације за Hcy, који износе 8,3% одн. 33,5% (8) указују на значајну биолошку варијацију. За њу се најчешће сматрају старост, пол, трудноћа и начин живота (2, 9). Концентрација Hcy се континуирано повећава током живота и у старости најчешће има душло већу вредност него у детињству (9). Вредности код мушкараца су у просеку 21–25% веће него код жена пре менопаузе што се објашњава разликама у мишићној маси и хормонском

профилу. Међутим, значај повећаног нивоа Нсу као фактора ризика за настанак васкуларних болести, сматра се једнаким код оба пола (9–11). У трудница се уочава снижење концентрације Нсу које се приписује хемодилуцији и смањеној концентрацији албумина (2, 9). Уношење фолне киселине и витамина Б12 снижава ниво Нсу. Пушење и конзумација кафе могу довести до пораста нивоа, док унос етанола показује различит утицај. Седентарни стил живота се такође повезује са порастом концентрације Нсу (9).

Препоручене вредности за концентрацију Нсу зависе од старости као и од тога да ли је особа на режиму суплементације фолном киселином, конзумирањем обогаћене хране односно коришћењем препарата. Код трудница и деце до 15 година који нису на режиму суплементације препоручене вредности би требало да су мање од 10  $\mu\text{mol/L}$ , код одраслих до 65 година испод 15  $\mu\text{mol/L}$ , док након те старосне границе вредности не би требало да премаше 20  $\mu\text{mol/L}$ . Уколико се примењује суплементација препоручене вредности су мање за 2–4  $\mu\text{mol/L}$  (9). Међутим анализа података о повезаности пораста концентрације Нсу и ризика за настанак кардиоваскуларних обољења указала је на потрбу за нижим препорученим вредностима. Резултати Фрамингемске студије су показали повећање ризика код особа са концентрацијом Нсу изнад 11,4  $\mu\text{mol/L}$  (12), док су извесни аутори уочили чак дупло повећан ризик повезан са нивоом Нсу већим од 10,2  $\mu\text{mol/L}$  (13). У складу са овим подацима је промењен концепт препоручених вредности, увођењем "граничне" зоне, која обухвата концентрације 12–15  $\mu\text{mol/L}$  (13, 14).

### 1. 1. 3. Хиперхомоцистеинемија - подела и узроци

Хиперхомоцистеинемија (ННсу) може имати благу (15–25  $\mu\text{mol/L}$ ), умерену (25–50  $\mu\text{mol/L}$ ) и тешку (50–500  $\mu\text{mol/L}$ ) форму. Осим по нивоу Нсу, наведени облици се разликују и по учесталости и узроцима (15).

Блага ННсу је најчешћа и узрокована је присуством полиморфизама у гену за МТНFR, умереним недостатком фолата и/или витамина Б<sub>12</sub>, смањеном бубрежном функцијом, хипотироидизмом и деловањем одређених лекова (9). Највише проучавани полиморфизам у гену за МТНFR је С677Т. Доводи до замене аланина валином и смањења активности, за 35% у случају СТ односно за 70% код ТТ генотипа. Последишно се региструје и смањен ниво фолата у еритроцитима, за 10% код СТ односно 18% код ТТ генотипа, као и повишена концентрација Нсу код појединаца са ТТ генотипом у просеку за 2,5  $\mu\text{mol/L}$  у односу на особе са СС генотипом (9, 16). Учесталост Т алела варира међу популацијама и може се наћи у опсегу 7–40% (17). Полиморфизам МТНFR А1298С је такође проучаван, премда у значајно мањем обиму. Услед замене аланина глутаматом долази до смањења активности које је мање наглашено у односу на МТНFR С677Т. Подаци о утицају полиморфизма на промене концентрација фолата и Нсу су неусаглашени (16). Хомозиготно присуство овог полиморфизма се јавља са просечном учесталошћу око 9%, а хетерозиготно са приближно 37% (17). Фолат и витамин Б<sub>12</sub> учествују као кофактори у реметилацији Нсу, па неквалитетна исхрана или малапсорпција ових супстанци може довести до ННсу. Појава благе ННсу у случајевима субклиничког недостатка ових витамина дала је основу да се одређивање Нсу препоручи као метаболички маркер недостатка ових витамина у општој популацији (18–22). Смањена гломеруларна функција, хипотиреоидизам и узнапредовала фаза шећерне болести су најчешћа стања и болести која узрокују благу ННсу (9). Примена релативно великог броја лекова може као нежељени ефекат имати појаву благе ННсу. Метотрексат, триметоприм, фенитоин и карбамазепин се понашају као анти-фолатни агенси, а азот-моноксид метформин, Н<sub>2</sub> блокатори и омепразол као антагонисти витамина Б<sub>12</sub>. L-ДОПА повећава синтезу Нсу служећи као акцептор метил групе са S-аденозил-Met, а циклоспорин успорава транссулфурациони пут (9, 23–26).

Умерена ННсу има приближно 10 пута мању учесталост од благе форме. Као најзначајнији узроци се наводе тешка дефицијенција фолата и/или витамина  $B_{12}$ , као и узрапредовали стадијуми бубрежне инсуфицијенције (15).

Учесталост тешке ННсу је око 500 пута мања у односу на благи облик и карактеристична је за особе са хомоцистинуријом. Најчешћи узрок овог урођеног метаболичког поремећаја је дефицијенција CBS (9).

#### 1. 1. 4. Механизми штетног деловања хиперхомоцистеинемije

У основи штетног деловања ННСу је поремећај функција ендотела који настаје као последица развоја оксидативног стреса, проинфламаторних механизма, нарушавања равнотеже у хемостазном систему, умањене биорасположивости NO, промена у структури и функцији протеина, апоптозе и епигенетских модификација (15, 27). Неопходно је нагласити да штетни ефекти постају много израженији након превођења Нсу "нагомиланог" унутар ћелије у Нсу-тиолактон, реакцијом коју катализује метионил-тРНК синтетаза (EC 6.1.1.10) (28, 29). Нсу-тиолактон се разграђује деловањем параоксоназе 1 (PON1/EC 3.1.8.1) (28), ензима који се у циркулацији налази везан за честице липопротеина велике густине (HDL). Осим "детоксикације" Нсу-тиолактона, PON1 "штити" честице липопротеина мале густине (LDL) од оксидативног оштећења и учествује у метаболизму лекова и других ксенобиотика. На активност утицај показују полиморфизми у гену за PON1, али и бројни стечени фактори као што су унос фолне киселине, антиоксиданата, конзумација алкохола итд (30).

Развој оксидативног стреса у ННСу се објашњава комбинованим ефектом повећаног стварања слободних радикала и смањеном синтезом компоненти система антиоксидатне заштите (31). Тиолна група се лако оксидује при чему настају супероксидни и дисулфидни анјон, тиол радикали и  $H_2O_2$  (28). Најзначајније последице овако изазваног пораста

нивоа слободних радикала су ендотелна дисфункција, оксидација липопротеина, активација леукоцита и тромбоцита као и директно ћелијско оштећење (32). Показано је да HHCy може довести до смањења синтезе глутатиона унутар ћелије, што је објашњено конкуренцијом за исти трансмембрански транспортни систем између Hcy и цистеина, компоненте глутатиона (33). Повишење концентрације Hcy утиче и на експресију гена за ензиме укључене у регулацију редокс равнотеже у ћелији и то тако што се експресија гена за супероксид дисмутазу (EC 1.15.1.1) (SOD) повећава (33), а за глутатион пероксидазу (EC 1.11.1.9) (GPx) смањује (34). Такође се сматра да се између HHCy и оксидативног стреса успоставља "зачарани круг"-иницијална оксидативна оштећења доводе до значајног смањења нивоа фолата које за последицу има даље "нагомилавање" Hcy (32).

Повећано стварање слободних радикала у HHCy се у великој мери сматра одговорним за покретање проинфламаторних механизма. Поред тога и саме повишене концентрације Hcy могу започети и/или појачати инфламаторни одговор и продукцију цитокина (моноцитног хемоатрактантног протеина-1, интерлеукина 1 $\beta$ , 6 и 8). Стања генерализоване инфламације нису удружена са HHCy па се сматра да пораст нивоа Hcy представља "окидач", а не маркер инфламације (15, 33).

Равнотежа у систему хемостазе се у стању HHCy "помера" у смеру хиперкоагулабилности из више разлога. Показано је да Hcy и Hcy тиолактон потенцирају адхезију активираних тромбоцита, при чему је ефекат и до хиљаду пут израженији код тиолактона (35). Услед везивања Hcy за пети фактор коагулације делимично се онемогућава његова инактивација деловањем активираних протеина Ц. Такође долази и до инхибиције деловања тромбомодулина, а на површини ендотела се смањује капацитет везивања антитромбина, највероватније услед прекомерног стварања H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ефективност фибринолизе је смањена услед инхибиције превођења плазминогена у плазмин (15), али и измењене структуре угрушка која отежава деловање плазмينا (36, 37).



Биорасположивост NO је снижена у HHCy услед пада активности азот оксид синтазе, отежаног уласка аргинина у ћелије и трошења насталих количина NO у реакцији са слободним радикалима (38). Недостатак NO у садејству са смањеним стварањем одређених вазоактивних медијатора (ендотелин-1, простациклини) додатно доприноси ендотелној дисфункцији (15).

Поред убрзања деградације (39), HHCy може довести и до веома значајних промена у структури и функцији различитих врста протеина. Грађењем дисулфидних мостова између Hcy и различитих протеина настају S-хомоцистеинил деривати. Међутим, много озбиљније последице има грађење N-хомоцистеинил деривата, у реакцији  $\epsilon$ -амино групе лизина са Hcy-тиолактоном (15, 28). Овако настали протеини су склони стварању агрегата који доводе до оштећења ендотела иницирајући "стрес ендоплазматског ретикулума" (40). Осим тога код појединих протеина попут албумина, LDL-а, фибриногена, антитрипсина описан је и губитак функције различитог степена (15). Појава аутоантитела на ове деривате може објаснити зашто се штетне последице јављају чак и када су присутни у веома малим количинама (41).

Апоптотски механизми су одговорни за директне цитотоксичне ефекте Hcy односно Hcy-тиолактона на ендотелним ћелијама и кардиомиоцитима. Поред активације каспазе-3 у овим процесима долази до унутарћелијске транслокације никотинамид аденин динуклеотид фосфат зависних (NADPH) оксидаза и пораста концентрације нитротирозина чиме је показано да су цитотоксични и прооксидантни ефекти HHCy међусобно повезани (28, 42–44).

Резултати клиничких студија нису показали да кардиоваскуларни "догађаји" имају мању учесталост код болесника који узимају фолат и витамин B<sub>12</sub> у циљу смањења нивоа Hcy, што је дало повода за претпоставку да између HHCy и развоја васкуларне патологије "посредују" епигенетички механизми, прецизније метилација ДНК. За HHCy је

карактеристично да доводи до хипометилације ДНК услед нагомилавања S-аденозил-Hcy који инхибира већину метилтрансфераза (45, 46). Према се сматра да метилација ДНК најчешће доводи до смањења експресије гена, постоји могућност и за активацију транскрипције, услед присуства молекула који се везују за метиловане нуклеотиде или путем наизменичних циклуса метилације/деметилације (47–49). Приликом процене клиничког значаја описаних промена у интензитету метилације потребно је узети у обзир различите чиниоце попут брзине ћелијског циклуса, доступност хроматина, расположивост S-аденозил-Met и фолата, степен и дужину трајања Hcy, инфламацију, дислипидемију, оксидативни стрес и старење. Такође треба размотрити ограничену поузданост тестова који процењују укупни степен метилације с обзиром да се метилација не дешава истим интензитетом на целој ДНК (50). Додатни епигенетички механизми који се повезују са Hcy су ремоделовање хроматина (51) и промене у експресији микроРНК (52).

#### 1. 1. 5. Клинички значај хиперхомоцистеинемije

Тешки облик Hcy указује на присуство урођених поремећаја регулације метаболизма Hcy, у првом реду на недостатак CBS (9, 15). Овај генетски поремећај је аутозомно рецесивног карактера и на светском нивоу показује просечну учесталост од 1 на 300 000 новорођене деце. За особе са недостатком CBS је карактеристично да су још од изузетно младог животног доба изложене повећаном ризику за развој тромбоемболијских поремећаја, који неретко могу имати и леталан исход (9). Умерена Hcy се појављује у терминалним стадијумима инсуфицијенције бубрега као и код особа са тешком дефицијенцијом фолата и витамина B<sub>12</sub>. Релативно често се као узрок хиповитаминозе наводи генетски дефицит протеина укључених у апсорпцију и транспорт поменутих витамина (15). Блага Hcy је најчешћа и од највећег значаја са аспекта општег јавног здравља јер представља фактор ризика за настанак кардио- и цереброваскуларних,

неуродегенеративних, психијатријских и гастроинтестиналних обољења, остеопорозе, дијабетеса итд (3, 4).

Велику пажњу истраживача је привукла и могућност да се кроз превентивну и терапијску надокнаду витаминима неопходних у метаболизму Нсу умањи ризик настанка поменутих врста обољења. Ефекти фортификације зрна житарица фолатом су показали позитивне ефекте на редукцију нивоа Нсу, али је и запажено да исхрана овако модификованим житарицама може појачати клиничке симптоме недостатка витамина Б<sub>12</sub> (пернициозна анемија, когнитивни поремећаји). Претпоставља се да би комбинована фортификација са ова два витамина могла унапредити постојећи превентивни приступ (53). У терапијском приступу дозирање је вршено у складу са концентрацијом Нсу, али и присуством додатних фактора ризика. Код особа са нивоом Нсу у опсегу 12–20  $\mu\text{mol/L}$  и породичном историјом срчаних обољења, хипертензије и дислипидемије препоручене количине су износиле 2000  $\mu\text{g}$  фолне киселине, 500  $\mu\text{g}$  витамина Б<sub>12</sub> и 50  $\text{mg}$  витамина Б<sub>6</sub>. У случају да се концентрација Нсу нађе између 16 и 30  $\mu\text{mol/L}$  код особа са ангином пекторис, бубрежним обољењима и дијабетесом препоручују се удвостручене дозе витамина (54).

Највећи број студија о клиничком значају је посматрао ННсу као фактора ризика за настанак кардиоваскуларних обољења (3, 4). Доказана је позитивна корелација са инциденцом акутног инфаркта миокарда, чак и у присуству традиционалних фактора ризика, при чему динамика промене концентрације може бити различита (55–57). Испитивања у српској популацији су показала да болесници са акутним инфарктом миокарда и ангином пекторис имају веће вредности Нсу него здраве особе (2, 58). ННсу може представљати фактор ризика и за настанак венског тромбоемболизма, али је степен асоцијације значајно мањи него код артеријских тромбоза (59–62). Резултати скоријих испитивања су указали да ННсу може представљати фактор ризика за настанак артеријске

хипертензије (63, 64). Међутим досадашње клиничке студије нису показале да терапијске мере суплементације са циљем редукције или превенције ННсу доводе и до значајног смањења општег кардиоваскуларног морталитета и морбидитета. Овакви резултати указују да би даља клиничка испитивања ННсу требало усмерити ка специфичним групама кардиоваскуларних болесника (65–68).

Присуство ННсу представља фактор ризика за настанак можданог удара, нарочито код млађих болесника (69, 70). Терапија фолатом са циљем редукције ННсу је дала боље резултате у примарној превенцији, док су у секундарној аналогни ефекти изостали (71).

Код 10–30% оболелих од Паркинсонове болести долази до развоја ННсу (72) и повезује се са развојем коморбидитета (деменција, депресија, дискинезија и сл.) (73). Поремећај метаболизма Нсу је повезан са развојем Алцхајмерове болести и других врста деменција (74–76). До сада није било већих клиничких студија које би процениле ефикасност суплементације витаминима у превенцији развоја неуродегенеративних обољења премда прелиминарна истраживања указују да би ефекти могли бити бољи него у области кардиоваскуларне патологије (77). Показано је да је поремећај у регулацији метаболизма Нсу повезан са повећањем ризика за настанак депресије за 26% као и да витаминска надокнада доводи до редукције како нивоа Нсу тако и клиничких симптома депресије (78, 79).

Протромботско деловање ННсу се може манифестовати и на нивоу гастроинтестиналног система (мезентерична тромбоза, инфаркт црева) (80). Појава ННсу је забележена и код опстипације, Кроне и других инфламаторних обољења црева, као и код колоректалног карцинома. Поуздани подаци о ефективности витаминске надокнаде код ових група болесника за сада нису расположиви (81, 82).

Познато је да Нсу може утицати на процес ремоделовања костију тако што повећава остеокластну и смањује остеобластну активност, смањује проток крви кроз коштану ткиво, активира матрикс

металопротеиназе и показује директно цитотоксично дејство. Негативне промене биомеханичких карактеристика костију у стању ННсу односно недостатка фолата и витамина Б<sub>12</sub> су доказане, али је такође и постулирано да надокнада витамина може побољшати ове карактеристике и механизмима који су независни од Нсу (83).

Промене у метаболизму Нсу код болесника са шећерном болешћу су нешто специфичније. У иницијалној фази болести, без обзира на тип, долази до смањења концентрације Нсу, да би у каснијим стедијумима болести, дошло до развоја ННсу, највероватније услед смањења бубрежне функције (84–86). Додатно, и терапијски приступ може утицати на ниво Нсу. Терапија инсулином показује повољан утицај и на поремећен метаболизам Нсу (87), док се примена оралних антидијабетика сматра једним од јатрогених узрока ННсу (24, 26).

Присуство ННсу је важан фактор који доприноси прогресији бубрежне инсуфицијенције. Претпоставља се да до гломеруларне склерозе долази услед оштећења подоцита, узрокованим активацијом инфлазама у мијелоидним ћелијама великом количином слободних радикала која настаје у ННсу (88). Рутинско одређивање концентрације Нсу код ових болесника није препоручено, премда постоје подаци да снижење нивоа Нсу за више од 20% има позитивне ефекте у редукцији кардиоваскуларног ризика. Поред суплементације витаминима за болеснике на хемодијализи постоји и могућност да се елиминација Нсу поспешује давањем тиолних деривата који истискују Нсу из комплекса са протеинима чиме се олакшава његов пролаз кроз дијализне мембране (89, 90).

#### 1. 1. 6. Одређивање концентрације хомоцистеина

Велики број преаналитичких фактора може имати утицај на резултате одређивања. Узорковање крви се препоручује ујутру, 10–12 часова након лаганог оброка који не садржи велике количине протеина

животињског порекла који представљају извор метионина и могу довести до пораста концентрације Hcy (2, 9, 91). Венепункцију треба изводити у седећем, а не у лежећем положају да би се избегло смањење концентрације Hcy услед снижења нивоа албумина. Као узорак се могу користити серум и плазма добијена коришћењем етилендиаминотетраацетата (ЕДТА) као антикоагуланса. Метаболизам Hcy у еритроцитима се наставља након венепункције и може довести до пораста концентрације чак и до 35% за 4 сата стајања на собној температури (2). Да би се овакав ефекат избегао неопходно је да се узорак одмах након венепункције смести у посуду са ледом, центрифугира у року од 1 часа и одвоји серум односно плазма (2, 9). У исту сврху поједини аутори препоручују коришћење вакуум епрувета у којима се налазе инхибитори изласка Hcy из еритроцита као што су натријум флуорид, 3-деаза-аденозин и лимунска киселина. Благо хемолизирани узорци се могу користити за одређивање Hcy. Концентрација је стабилна 4 дана у узорцима серума и плазме чуваним на собној температури, неколико недеља на 4–8 °C односно неколико година на –20 °C (9).

Први корак у одређивању, након депротеинизације је редукција Hcy којом се различити облици у којима се Hcy налази у крви преводе у један, тиолни облик. Као редукциони агенси се користе тиоалкохоли (дитиотреитол, дитиоеритритол и меркаптоетанол), борохидрати алкалних метала и фосфини (три-*n*-бутил фосфин, трис-2-карбоксиетил фосфин) (2). Слободни облик се директно може квантификовати коришћењем течне хроматографије високе ефикасности (HPLC) са електрохемијском детекцијом као и течне хроматографије са двојном спектрометријом маса (LC-MS-MS). Уколико се не користе ове методе неопходно је извршити хемијску дериватизацију Hcy са флуорогеним агенсима, односно превођењем у S-аденозил-Hcy деловањем АНН. Деривати са флуоресцентним особинама се могу квантификовати коришћењем HPLC са флуориметријском детекцијом, гасне

хроматографије са спектрометријом маса (GC-MS), капиларне електрофорезе као и на аминоканализаторима. За мерење количине насталог S-аденозил-Hcy могу се користити различита имуноодређивања (флуоресцентно поларизационо, електро-хемилуминисцентно, ензимско и хемилуминисцентно на микрочестицама) (2, 9). Код већине имунохемијских метода могућа је потпуна аутоматизација аналитичког процеса. Из овог разлога се оне најчешће користе у лабораторијско-дијагностичкој пракси, док је HPLC са флуориметријском детекцијом нашла примену у значајно мањем броју лабораторија (2).

Резултати студије спроведене у једном од америчких дијагностичких центара адекватно одсликавају трендове у захтевима за анализирање хомоцистеина. Врло изражени пораст броја тестирања је забележен у периоду од 1997. до 2003. године. Након објављивања налаза клиничких студија који нису потврдили ефикасност витаминске суплементације, 2004. односно 2006. године, број захтева је значајно смањиван и усталио се 2008. године. У општој популацији најчешћи разлог за тестирање је сумња на присуство дефицијенције фолата и витамина B12, као и испитивање тромбофилије. Одређивање са циљем процене кардиоваскуларног ризика је и даље присутно, али је значајно мање учестано и врши се у специфичним групама болесника (92). Такође, квантитативна анализа је незаобилазна у дијагностици урођених грешака метаболизма Hcy (2).

## 1. 2. Хронична опструктивна болест плућа (ХОБП)

Хроничну опструктивну болест плућа (ХОБП) карактерише прогресивна опструкција протоку ваздуха у дисајним путевима, која може бити делимично реверзибилна или у потпуности ирреверзибилна. У патофизиолошкој основи овог обољења се налази појачан инфламаторни

одговор на штетне честице и гасове. Ограничен проток ваздуха настаје комбинованим деловањем два патофизиолошка ентитета: опструктивног бронхиолитиса и емфизема, поремећаја који представља трајно повећање ваздушног простора дистално од терминалне бронхиоле, деструкцију плућног паренхима, губитак еластичне ретрактилности плућа и затварање малих дисајних путева. Између оболелих постоји изражена варијабилност у погледу степена у којима су изражени поменути поремећаји (93).

### 1. 2. 1. Епидемиологија и узроци

ХОБП је значајан узрок морталитета и морбидитета у популацији одраслих широм света. Глобална учесталост ове болести се креће између 4 и 10% (94), при чему се процењује да 60–85% болесника са благом и умереном формом болести није дијагностиковано (95). Предвиђања указују да ће до 2020. године, ХОБП постати трећи по реду узрок смрти широм света (93). Подаци везани за популацију Републике Србије указују на 400 000 до 600 000 оболелих (96).

Пушење се сматра главним узроком и процењује се да 10–20% пушача развије ХОБП (97). Међутим значајни су и други фактори који могу повећати ризик и довести до појаве болести и код непушача. Деца мајки пушача као и она са честим респираторним инфекцијама имају повећани ризик. Аерозагађење, изложеност прашини и штетним гасовима и пасивно пушење су најчешће навођени фактори који увећавају ризик код одраслих (95).

На значај генетичких фактора указала је чињеница да је опструкција ваздушних путева израженија код особа у првом степену сродства са оболелима од ХОБП у односу на контролне испитанике (98, 99). Генетска предиспозиција за ХОБП се повезује са групама гена одговорним за равнотежу протеиназе-антипротеиназе, укљученим у одржавање равнотеже оксиданти-антиоксиданти, регулацију имунског одговора, инфламације, продукције мукуса и мукоцилијарног клиренса



(100). Дефицијенција  $\alpha_1$ -антитрипсина (AATD) је тренутно најбоље описани генетички фактор ризика. Примарна физиолошка улога овог протеина је заштита плућног паренхима од прекомерног деловања еластазе. Концентрација  $\alpha_1$ -антитрипсина (AAT) у крви здравих особа износи од 0,9 до 2,0 g/L. AATD је генетски поремећај узоркован хомозиготним присуством једног или комбинованим хетерозиготним присуством два дефицијента алела SERPINA1, гена за AAT. За разлику од функционалних (M) алела, ове варијанте су повезане са смањеном функционалношћу и нивоом AAT у крви, услед којих долази до пораста еластазне активности. По фреквенцији појављивања дефицијентни алели су подељени на "честе" (Z, S) и ретке (Mmalton, Siiyama, Mheerlen, Mprocida, нулти и др) (101). Учесталост AATD међу оболелим од ХОБП се креће у опсегу 1–5% и најчешће обухвата болеснике млађе животне доби. Међутим, у више од 95% случајева AATD остаје неоткривена (102). Осим за ХОБП, присуство AATD повећава и ризик за настанак обољења јетре, попут цирозе или хепатоцелуларног карцинома (101). Препоруке Светске здравствене организације и различитих пулмолошких удружења наводе потребу за "screening" одређивањем концентрације AAT код болесника са ХОБП, посебно код оних којима је болест дијагностикована у млађем животном добу или имају позитивну породичну анамнезу. У случају снижених концентрација даља испитивања укључују фено- или генотипизацију (101). С обзиром да бројни стечени фактори, као што су инфламација, болести јетре или бубрега, значајно утичу на поузданост налаза концентрације AAT, предложено је да се "screening" приступ замени интегративним лабораторијским алгоритмом који на комплементаран начин комбинује биохемијске и молекуларно-биолошке методе.

### 1. 2. 2. Патофизиолошки механизми

Опструкција протока ваздуха током експиријума код болесника са ХОБП је примарно иреверзибилна и резултат је инфилтрације инфламаторним ћелијама, ремоделовања, фиброзе и присуства мукусних чепова у малим дисајним путевима (терминални бронхиолитис). Сужење малих дисајних путева доводи до хиперинфлације плућа, која нису у стању да се празне, што се клинички манифестује диспнејом, која је са прогресијом болести присутна и током мировања. Пораст отпора у периферним дисајним путевима је последица губитка еластичности и деструкције алвеоларних веза што резултира губитком подршке и затварањем малих дисајних путева током експиријума. Описани процеси су повезани и на молекуларном нивоу, где се остварују заједничким деловањем механизма оксидативног стреса, инфламације и апоптозе. Такође је потребно нагласити да фактори ризика најчешће активирају поменуте механизме истовремено (104, 105).

Услед високог садржаја слободних радикала и других про-оксиданата (106), изложеност дуванском диму изазива оксидативни стрес, инфламацију, поремећаје ћелијског раста и репарације, апоптозу, оштећује међућелијски матрикс, олакшава настанак инфекција и убрзава процесе старења. Поменути процеси су посредовани активираним неутрофилима, макрофагима, дендритичним ћелијама, лимфоцитима, фибробластима и глатким мишићним ћелијама који ослобађају бројне цитокине, протеазе и реактивне кисеоничне врсте. Значајним се сматра и допринос аутоимуних механизма које потврђује присуство антитела на протеине оштећене хроничним дејством дуванског дима (нпр. антиеластин-антитела, антиепителијална-антитела итд) (105, 107). Дувански дим доводи и до активације ћелија респираторног епитела и продукције медијатора инфламације (фактор некрозе тумора  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), интерлеукини (IL)  $1\beta$  и 8, епидермални фактор раста, васкуларни ендотелни фактор раста итд.), дефенсина и других пептида са

антимикробним деловањем. Повећано је и стварање мукуса од стране пехарстих ћелија који штити од бактерија и штетних честица. Респираторни епител оболелих често показује и сквамозне метаплазије услед повећане пролиферације ћелија (108).

Аерозагађење се сматра фактором ризика за ХОБП услед тога што присутни гасови ( $O_3$ ,  $SO_2$ ,  $NO_2$ ) и микро честице делују про-оксидантно и про-инфламаторно у контакту са плућним епителом и узрокују оксидативни стрес. Последично долази до смањења функције плућа, инфламације, респираторне хиперреактивности, модификације имунског одговора итд (109).

До сада су предложена два механизма путем којих бактеријске и вирусне инфекције учествују у настанку и прогресији ХОБП. Први се заснива на чињеници да су инфекције најчешћи покретач егзацербација. Са друге стране колонизација и хроничне инфекције доњих делова респираторног тракта могу повећати и одржавати интензитет хроничног инфламаторног одговора код болесника у стабилној фази болести (105, 110–112).

Неравнотежа у систему протеиназе-антипротеиназе представља једну од теорија патогенезе ХОБП. Протеолиза везивних компоненти плућа, нарочито еластина, различитим протеиназама представља кључни механизам у настанку. Овом хипотезом се може објаснити повезаност ААТД и настанак ХОБП, која је најбоље описана код хомозиготних носилаца Z алела. Услед стварања агрегата мутираног протеина у хепатоцитима, до плућа циркулацијом доспева изузетно мала количина ААТ, чиме се повећава количина неинхибиране неутрофилне еластазе што даље доводи до повећане разградње алвеоларног еластина. Дефицијенција има и два додатна аспекта. Први се односи на нефункционалност мутираних молекула ААТ тј. смањен афинитет према НЕ. Други се заснива на чињеници да и у плућима долази до стварања агрегата мутираних молекула ААТ који имају изражено

хемотаксично дејство. На овај начин "привучени" неутрофили се додатно задржавају у интестицијуму, где их агрегати ААТ активирају, што ослобађа додатне количине еластазе (113). Код оболелих пушача, компоненте дуванског дима потенцирају агрегацију и оксидативно оштећују молекуле ААТ, чиме је убрзан настанак емфизема (114). Не треба занемарити ни могућност, која до сада није интензивно проучавана, да агрегати ААТ у плућима константно активирају нуклеарни фактор  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), чиме се убрзава синхрона апоптоза у великом броју алвеоларних ћелија (113). Поред ААТД, теорија нарушене равнотеже активности протеаза и антипротеаза је обухватила и протеиназу 3, катепсине и матрикс металопротеиназе 1, 9 и 12. (108, 115).

Једна од најистакнутијих молекуларних карактеристика ХОБП, оксидативни стрес, може бити узрокован ксенобиотицима из дуванског дима или загађеног ваздуха, али и прекомерном продукцијом слободних радикала од стране активираних неутрофила и макрофагама у плућима. (116, 117). Једињења настала пероксидацијом фосфолипида ћелијских мембрана поседују хемотаксична својства и способност додатне активације неутрофила, доводе до промена у ћелијској пролиферацији, активирају апоптотске путеве и индукују експресију проинфламаторних гена (118). Смањено антиинфламаторно деловање ендогених глукокортикоида у ХОБП се такође сматра последицом оксидативног стреса (107, 118). Антиоксидантна заштита у плућима обухвата ензимску детоксикацију ксенобиотика и директно деловање антиоксиданата присутних у течности која облаже плућа (муцини, редуковани глутатион, уреа, албумин и аскорбинска киселина). Ензимска неутрализација ксенобиотика започиње фазом биоактивације, деловањем цитохрома Р-450 и флавин зависних монооксигеназа, на коју се наставља фаза детоксикације, у коју су укључени глутатион-S-трансфераза, сулфо- и глукуронил-трансферазе као и микрозомална хидролаза епоксида. Варијанте у генима за ензиме

укључене у ксенобиотички метаболизам и одбрану од оксидативног стреса, представљају факторе ризика за настанак ХОБП (116, 119).

Инфламаторни процеси карактеристични за ХОБП се одигравају и у плућима пушача који нису оболели, али много мањим интензитетом. Као могући узроци појачаног инфламаторног одговора код болесника наводе се латентна аденовирусна инфекција, инхибиција епигенетичких механизма услед оксидативног стреса као и присуство мутација одн. полиморфизама у генима значајним за регулацију антиинфламаторних и антипротеазних процеса. Наведени узроци могу у извесној мери објаснити и чињеницу да престанак пушења не доводи до смањења инфламаторног одговора у плућима, поготову у тежим облицима болести (108).

### 1. 2. 3. Дијагностиковање, ток и лечење

Тегобе узроковане ХОБП почињу да се испољавају годинама након првих знакова инфламације, патофизиолошких промена и поремећаја дисајне функције, најчешће када је особа у средњој и старијој животној доби. Ранија појава обољења је карактеристична за болеснике са генетским факторима ризика. Први знаци болести обично су кашаљ и искашљавање, који могу трајати и неколико година пре него што дође до бронхоопструкције. Болест се најчешће дијагностикује тек када тегобе, пре свега диспнеја, почну да угрожавају свакодневне активности или када дође до егзацербације болести (96).

Дијагностиковање и процена тежине ХОБП се заснива на спирометријским мерењима - постбронходилататорном форсираном експиријумском волумену у првој секунди ( $FEV_1$ ), форсираном виталном капацитету плућа (FVC) и њиховом односу ( $FEV_1/FVC$ ). Основни критеријум за дијагностику ХОБП је вредност  $FEV_1/FVC$  испод 0,7. На основу вредности  $FEV_1$  процењује се тежина болести односно изражава као један од четири стадијума, названих према акрониму организације Global initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD). У Табели I су

наведени тежина болести и спирометријски критеријуми који одговарају GOLD стадијумима.

Табела I GOLD стадијуми, тежина болести и вредности FEV<sub>1</sub> (93).

Стадијум	Тежина болести	FEV <sub>1</sub> (%)
GOLD 1	благ	> 80 %
GOLD 2	умерен	50-80 %
GOLD 3	тежак	30-50 %
GOLD 4	веома тежак	< 30 %

Дефиниција коју је GOLD усвојио, егзацербација ХОБП представља акутни догађај окарактерисан погоршањем респираторних симптома које превазилази оквире уобичајних варијација "из дана у дан" и захтева промену у лечењу болесника (93). Манифестују се као периоди интензивираниог кашља, диспнеје и стварања спутума у трајању од најмање 48 часова (95). У 60–80% узроковане су бактеријским (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*) или вирусним инфекцијама (инфлуенца, риновируси). Остали преципитирајући фактори укључују срчану инсуфицијенцију, плућни тромбоемболизам, пнеумоторакс, пушење, изложеност аерозагађењу, непоштовање терапијског режима, боравак на хладноћи итд (120). Појава егзацербација је повезана са вишеструким погоршањем квалитета живота оболелих, убрзањем прогресије болести и повећањем ризика од развоја коморбидитета и смртог исхода. Због ових разлога се болесници са честим егзацербацијама издвајају као специфична подгрупа оболелих. За сада нема биомаркера који би са задовољавајућом поузданошћу могао предвидети појаву егзацербација (95, 121).

Оболели од ХОБП су изложени значајном ризику од развоја великог броја коморбидитета у које спадају исхемијска болест срца, дијабетес, губитак мишићне масе, остеопороза, депресија и карциноми плућа (122,

123). Присуство коморбидитета смањује вероватноћу повољних здравствених исхода, повећава ризик од хоспитализације и смртог исхода, а нису занемарљиви ни трошкови медицинског збрињавања таквих болесника. Заједничко за ХОБП и придружена обољења и стања је присуство хроничне инфламације (95, 124). Полазна тачка у објашњењу атерогенезе код болесника са ХОБП је "преливање" проинфламаторних цитокина из плућа у системску циркулацију. Њихови системски ефекти обухватају индукцију синтезе CRP, фибриногена и фактора VIII као и пораст броја неутрофила, моноцита и тромбоцита. Са друге стране хипоксија доводи до симпатикусне и активације система ренин-ангиотензин те на тај начин појачава ендотелну дисфункцију и повећава стварање адхезионих молекула. Њихово стимулативно деловање на агрегацију тромбоцита, хемотакса моноцита и макрофага у садејству са повећаним преузимањем оксидованог LDL-а доводи до стварања атеросклеротских плакова. Егзацербације ХОБП представљају додатне инфламаторне стимулусе који могу довести до дестабилизације и руптуре плака, са последичним развојем атеротромботичких догађаја (125).

Код оболелих пушача први корак у лечењу ХОБП је престанак пушења чиме се успорава напредовање болести и морталитет за 18% (126). Препоручује се и смањење изложености аерозагађењу и вакцинација против вируса грипа (95). Специфичне фармакотерапијске мере код болесника са стабилном ХОБП најчешће обухватају примену бронходилататора ( $\beta_2$  агониста или антихолинергика). У стадијуму GOLD 1 се примењују краткоделујући, док се у стадијумима 2, 3 и 4 комбинују са најмање још једним дугоделујућим бронходилататором. Инхалациона примена глукокортикоида је индикована у стадијумима 3 и у случајевима тешких егзацербација, с тим што се у последњем стадијуму по потреби уводи и оксигенотерпија. За болеснике у стадијумима 2, 3 и 4 препоручује се и респираторна рехабилитациона терапија. У случају развоја егзацербација повећавају се дозе и фреквенција давања бронходилататора,

у зависности од стања болесника препоручује се и перорална примена глукокортикоида, антибиотика, као и оксигенотерпија (95).

### 1. 3. Значај испитивања метаболизма хомоцистеина код

#### болесника са хроничном обструктивном болешћу плућа

На повезаност ХОБП и повишеног нивоа Нсу у плазми одн. сниженог нивоа редукованог глутатиона први је указао Andersson 2001. године (127). Резултати његове студије су првенствено послужили да потврде значај Нсу за развој оксидативног стреса карактеристичног за ХОБП. Након тога, уследиле су 3 унакрсне студије које су проучавале однос плућне функције, ХОБП и хомоцистеина у релативно малим групама оболелих пореклом из Јапана, Тринидада и Тобага, односно Италије (128–130). У све три студије је доказано да је ниво хомоцистеина значајно повећан у односу на здраве особе.

Поменуте студије се разликују у погледу резултата о утицаја пола, старости, недостатка витамина и хроничне инфламације на промене концентрације Нсу. У групи оболелих у Јапану нису испитивани утицаји поменутих фактора (128). Seemungal и сарадници (129) су код групе оболелих са територије Тринидада и Тобага уочили веће вредности Нсу код мушкараца, док животна доб није показала значајан утицај. Концентрације Нсу код болесника италијанског порекла, укључених у студију Fimognari и сарадника (130), била је у корелацији са старосћу, а разлике између мушких и женских испитаника нису биле значајне. Повишен ниво CRP-а, традиционалног маркера инфламације, нађен је код болесника у обе студије, али је позитивна корелација са концентрацијом Нсу је потврђена само у студији Seemungal и сарадника (129, 130). Такође у тој студији није доказана повезаност дефицита витамина и појаве ННсу, али треба имати у виду да је присуство хиповитаминозе процењивано на



основу података о начину исхране добијених анкетирањем оболелих (129). Код групе италијанских болесника одређиване су концентрације витамина у серуму и доказано је да су недостатак фолата и витамина B<sub>12</sub> значајни предиктори појаве ННсу (130). Бројни нутритивни поремећаји попут убрзаног базалног метаболизма, смањеног индекса телесне масе удруженог са губитком скелетне мускулатуре, чине оболеле од ХОБП склоним развоју дефицита фолата и витамина B<sub>12</sub> (130, 131), што је и експериментално доказано (132). Поред макроцитозе, когнитивних поремећаја и неуропатије, карактеристичних за тешке форме недостатка, код болесника са ХОБП значајна може бити и субклиничка дефицијенција обзиром да се повезује са бројним коморбидитетима као што су кардиоваскуларне болести, малигни тумори, остеопороза итд (133, 134). Стога се чини значајним да се испита повезаност ННсу и дефицита витамина и у супротном смеру, односно да се процени да ли пораст концентрације ННсу код ових болесника може бити маркер недостатка фолата и витамина B<sub>12</sub>.

Наследни узроци ННсу код оболелих од ХОБП до сада нису испитивани. Чињеница да су у све три претходно поменуте студије концентрације Нсу биле у интервалу који одговара благој ННсу, указује да је у групи ових болесника потребно испитати присуство полиморфизама MTHFR C677T и A1298C, као и последични утицај на концентрацију Нсу и учесталост ННсу.

Повезаност ННсу и AATD, до сада најбоље описаног генетског фактора ризика за ХОБП, такође није испитивана. Хипотеза о њеном постојању се може заснивати на постојању убрзане метилације ДНК, РНК и бројних протеина током репарације плућног паренхима, додатно оштећеног услед нарушене еластазно-антиеластазне равнотеже. Овај процес захтева да на располагању буде повећана количина метил група, а коришћење S-аденозил метионина као њиховог извора има за последицу генерисање додатних количина Нсу и појаву ННсу (135). Ови ефекти могу

бити појачани кроз заједничко проинфламаторно и прооксидантно дејство мутираних ААТ молекула односно њихових агрегата, о коме говоре и следећи подаци. Број неутрофила као и концентрација интерлеукина 8 односно леукотриена В4 у бронхоалвеоларном лавату су већи код оболелих од ХОБП са ZZ у односу на оне са MM генотипом (136–138). Поред хемоатрактантног деловања, агрегати мутираних ААТ молекула, формирану у плућном ткиву активирају и NF-кВ чиме се додатно активира експресија проинфламаторних цитокина-TNF  $\alpha$ , IL 1 $\beta$  и IL 8 (114). Продукцију слободних радикала од стране неутрофила и макрофага односно последично оксидативно оштећење биомолекула могу индуковати агрегати мутираних молекула ААТ (139), али и повећана количина деградационих продуката еластина за чији настанак је одговорна неадекватно регулисана активност еластазе (140).

У ширем контексту повезаности ННсу и тромбофилије, једним од преципитирајућих фактора за егзацербације, важно је нагласити да за популацију оболелих од ХОБП за сада нема довољно података о учесталости два најчешћа генетска фактора ризика за тромбофилију-мутација FV Leiden (FV G1691A) и F II G20210A. Ризик од настанка венског тромбоемболизма се повећава приближно пет пута у случају хетерозиготног присуства F V Leiden односно око четири пута код хетерозиготних носилаца FII G20210A мутације (141).

Досадашња сазнања указују да постоји значајан степен сличности између механизма помоћу којих ННсу остварује штетне ефекте и оних који су укључени у развој ХОБП и њених егзацербација односно одговарајућих коморбидитета. Посматрано са аспекта унапређења дијагностичко-терапијског приступа оболелима, од даљих испитивања се првенствено очекује да процене поузданост Нсу као биомаркера којим би се код оболелих од ХОБП могао процењивати ризик настанка коморбидитета. Испитивање утицаја наследних и стечених фактора на ниво Нсу код ових болесника је од двојаког значаја. Добијени резултати би

могли понудити додатна објашњења молекуларних механизма повезаних са поремећајем метаболизма Нсу код оболелих од ХОБП. Осим тога, на основу њих би се могло проценити које факторе је неопходно узети у обзир приликом интерпретације налаза ННсу односно који "reflex" тестови су неопходни у даљем медицинском збрињавању код ове групе болесника. Као крајњи резултат оваквог приступа би се могло очекивати успостављање интегративног алгоритма за испитивање ННсу код оболелих од ХОБП, у складу са начелима персонализоване медицине. У склопу ових разматрања неопходно је истаћи чињеницу да код оболелих од ХОБП у Републици Србији до сада није испитиван ниво Нсу у крви, као ни утицај који на њега показују извесни наследни фактори, недостатак витамина и инфламација.

## 2. Циљеви

Основни циљеви овог истраживања су били да се у групи болесника са ХОБП одреди, односно процени:

- ниво Нсу односно инциденца ННсу,
- утицај пола и старости на ниво Нсу,
- учесталост полиморфизама МТНFR С677Т и А1298С , као и њихов утицај на ниво Нсу и инциденцу ННсу,
- утицај концентрација фолата и витамина Б12 на ниво Нсу и инциденцу ННсу, као и могућност да се на основу појаве ННсу предвиди недостатак поменутих витамина.

Истраживање је за додатне циљеве имало да испита повезаност нивоа Нсу, односно инциденце ННсу са:

- присуством ААТD, и
- концентрацијом CRP.

Такође, циљ је био и да се процени заједнички утицај испитиваних фактора на ниво Нсу и инциденцу ННсу. У ширем контексту повезаности ННсу и тромбофилије, циљеви су обухватили и испитивање учесталости мутација FV Leiden и FII G20210A у истој групи.

## 3. Материјал и методе

### 3. 1. Дизајн студије

Опсервационо "case-control" истраживање је укључило болеснике из Клинике за пулмологију Клиничког центра Србије. Лабораторијска испитивања су урађена у Центру за медицинску биохемију Клиничког центра Србије и Институту за молекуларну генетику и генетички инжењеринг Универзитета у Београду. Етички одбор Клиничког центра Србије је дао сагласност за спровођење студије.

### 3. 2. Избор испитаника

Испитана је група од 50 болесника (28 мушкараца и 22 жене) којима је ХОБП дијагностикована пре 45. године живота. Просечна старост групе је износила  $49,0 \pm 14,5$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) година. Критеријум за дијагностиковање ХОБП су били  $FEV_1/FVC$  мањи од 0,7 и  $FEV_1$  испод 80%. Емфизем је био радиографски потврђен код 18 болесника. Амбулантно је било лечено 15, док је 35 хоспитализованих болесника укључено након стабилизације клиничке слике и постизања ремисије. Код испитиваних болесника није била присутна исхемијска болест срца, цереброваскуларни, бубрежни, гастроинтестинални и аутоимуни поремећаји, шећерна болест као ни малигнитети.

Контролну групу је сачињавало 48 здравих особа (20 мушкараца и 28 жена) старости  $47,2 \pm 9,7$  година. Заједнички критеријуми за обе групе испитаника су били да су непушачи, не конзумирају алкохол и не добијају фолну киселину и/или витамина  $B_{12}$  у терапијске или превентивне сврхе.

### 3. 3. Преаналитичка обрада узорака

Припрема испитаника за узимање узорка је подразумевала 12 часова гладовања након лаганог оброк без протеина животињског порекла. Венепункција је вршена ујутру, између 8 и 9 часова. Од сваког испитаника је узимано по 15 mL венске крви, узорковане у две Vacutainer® епрувете (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) - једну SST® II Advance и другу са 0,105 mol/L натријум цитратом. Одмах по узорковању узорци су смештани у посуду са ледом и транспортовани у лабораторију.

Серум је издвајан у року од 1 сата, након центрифугирања у трајању од 15 минута при убрзању од 1500g, и аликвортиран у 2 порције. Једна је одмах коришћена за одређивање концентрације испитиваних параметара. Друга је чувана на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  за случај да је било потребе за фенотипизацијом ААТ.

ДНК је изолована из крви узорковане са натријум цитратом, комерцијалним сетом регенаса Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK; каталошки број 28-9042-65), према упутствима произвођача. Метода изолације се заснива на заједничком деловању протеиназе К (ЕС 3.4.21.64) и "хаотропног" агенса, којим се постиже екстракција ДНК из леукоцита, денатурација хистона и омогућава селективно везивање ДНК за силика мембрану, смештену унутар колоне за "solid-phase" екстракцију. Након испирања колоне етанолним пуфером, ДНК се елуира редестилованом водом загрејаном на  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Изолована ДНК је чувана на  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  до испитивања, односно на  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  након тога. Према подацима произвођача, када се за изолацију користи хумана крв, концентрација ДНК у финалном елуату је у опсегу од 28-46 ng/ $\mu\text{L}$ , а чистоћа изоловане ДНК, изражена као однос  $A_{260}/A_{280}$ , износи  $1,7\pm 0,04$ .

### 3. 4. Одређивање концентрације хомоцистеина

Концентрација хомоцистеина (Hcy) је одређивана у серуму једноступеном СМИА. Одређивање започиње редукцијом различитих форми Hcy из серума до слободног Hcy који се преводи у S-аденозил хомоцистеин, деловањем АНН. Настали S-аденозил хомоцистеин се са својим акридилијумом обележеним аналогом "такмичи" за реакцију са моноклонским антителима, чијим су молекулима обложене микрочестице. Након испирања и раздвајања деловањем магнетног поља, додатком одговарајућих реагенса изазива се појава хемилуминисценције чији је интензитет обрнуто пропорционална концентрацији Hcy у серуму.

Коришћен је комерцијални сет реагенса (Homocysteine, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) на анализатору ARCHITECT® ci8200 Integrated System, истог произвођача. Према подацима произвођача реагенса коришћена метода има "within run" CV 1,2–4,0% одн. укупни CV 2,1–6,3%, границу детекције од 0,64  $\mu\text{mol/L}$  и опсег мерења од 1,0 до 50,0  $\mu\text{mol/L}$ . Опсег референтних вредности обухвата концентрације између 5,08 и 15,39  $\mu\text{mol/L}$ . На основу разматрања о горњој граници опсега референтних вредности, изнетих у уводном делу, у истраживању је под HHcy сматрана концентрација Hcy изнад 12,0  $\mu\text{mol/L}$ . Додатно, у испитивању поузданости HHcy као биомаркера дефицијенција фолата и витамина B<sub>12</sub> код ове групе болесника, тестиране су и концентрације Hcy од 10,0 односно 15,0  $\mu\text{mol/L}$  као граничне.

### 3. 5. Анализа генских варијанти MTHFR C677T, MTHFR A1298C, FV Leiden (G1691A) и FII G20210A

Анализе су вршене на узорцима ДНК, методом заснованом на реакцији ланчаног умножавања полимеразом (PCR) и реверзној хибридизацији са алел-специфичним олигонуклеотидима (rASO), која омогућава истовремену анализу наведених полиморфизама и мутација.

Поред комерцијалног сета реагенаса "ThromboType® plus" (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) коришћени су и PCR пуфер, MgCl<sub>2</sub> и ДНК полимераза, набављени од произвођача Affymetrix UK Ltd (High Wycombe, United Kingdom).

Смеша за PCR реакцију је припремана у DNA/RNA UV-CLEANER UVT-S-AR BOX-у (Biosan, Riga, Latvia).

Састав смеше је био:

- 17,5 µL смеше биотинилованих прајмера и деоксинуклеотида (компонента сета "ThromboType® plus")
- 2,5 µL PCR пуфера (100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, pH 8,6)
- 2,5 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L)
- 1,0 µL ДНК полимеразе (Hot Start-IT® Taq Polymerase, 1,25 un/µL)
- 2,5 µL изоловане ДНК

PCR реакција је извођена према протоколу приказаном у Табели II, коришћењем апарата Qcyler (LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria)

*Табела II Протокол PCR реакције за истовремену анализу генских варијанти MTHFR C677T, MTHFR A1298C, FVLeiden и FII G20210A.*

Иницијална денатурација:	5 минута на 95 °C	
35 поновљених циклуса	денатурација	30 секунди на 95 °C
	везивање прајмера	30 секунди на 54 °C
	полимеризација	30 секунди на 72 °C
Финална полимеризација	10 минута на 72 °C	

Детекција применом rASO је вршена у TwinCubator®-у (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), кроз следеће кораке: хемијска денатурација ампликона, хибридизација једноланчаних биотином обележених ампликона са алел-специфичним комплементарним олигонуклеотидима везаним за мембрану, испирање, додатак коњугата алакална фосфатаза/стрептавидин и додатак супстрата. По завршетку



бојене реакције, распоред обојених поља на мембрани указивао је на одсуство односно хетерозиготно или хомозиготно присуство испитиваних генских варијанти.

У оквиру оптимизације методе провераван је принос PCR реакције електрофоретском анализом ампликона на агарозном гелу, уз визуелизацију етидијум бромидом. Осим тога, тачност добијених резултата је проверена тако што је анализа урађена на узорцима 55 болесника са Клинике за васкуларну хирургију упућених на лабораторијско испитивање тромбофилије. Добијени резултати су упоређени са појединачно одређеним генотиповима у истим узорцима, применом PCR-а умножавања и анализе разлике у дужинама фрагмената добијених након деловања рестрикционих ендонуклеаза (RFLP) (142).

### 3. 6. Одређивање концентрације фолата

Концентрација фолата је одређивана у серуму методом двостепене СМИА. Фолат, који се у узорку серума налази у комплексу са ендогеним фолат-везујућим протеином, ослобађа се редукцијом у алкалној средини и реагује са егзогеним фолат-везујућим протеином којим су обложене парамагнетичне микрочестице. У другом кораку у реакциони систем се додаје акридијумом обележени коњугат птероичне киселине који гради комплекс са микрочестицама које нису "заузете" молекулима фолата из узорка. Додатком одговарајућих реагенаса изазива се појава хемилуминисценције чији је интензитет обрнуто пропорционална концентрацији фолата у серуму.

Коришћен је комерцијални сет реагенаса (Folate, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) на анализатору ARCHИТЕСТ® ci8200 Integrated System, истог произвођача. Према подацима произвођача реагенаса коришћена метода има "within run" CV 1,4–5,4% одн. укупни CV 3,1–7,8%, границу детекције од 0,50 µg/L и опсег мерења од 1,5 до 20,0 µg/L. Опсег референтних вредности износи од 3,1 до 20,5 µg/L. У складу са

разматрањима у уводном делу, при испитивању поузданости ННсу као биомаркера дефицијенције фолата, као cut-off вредности су коришћене концентрације од 4,0, 6,6 и 8,0 µg/L.

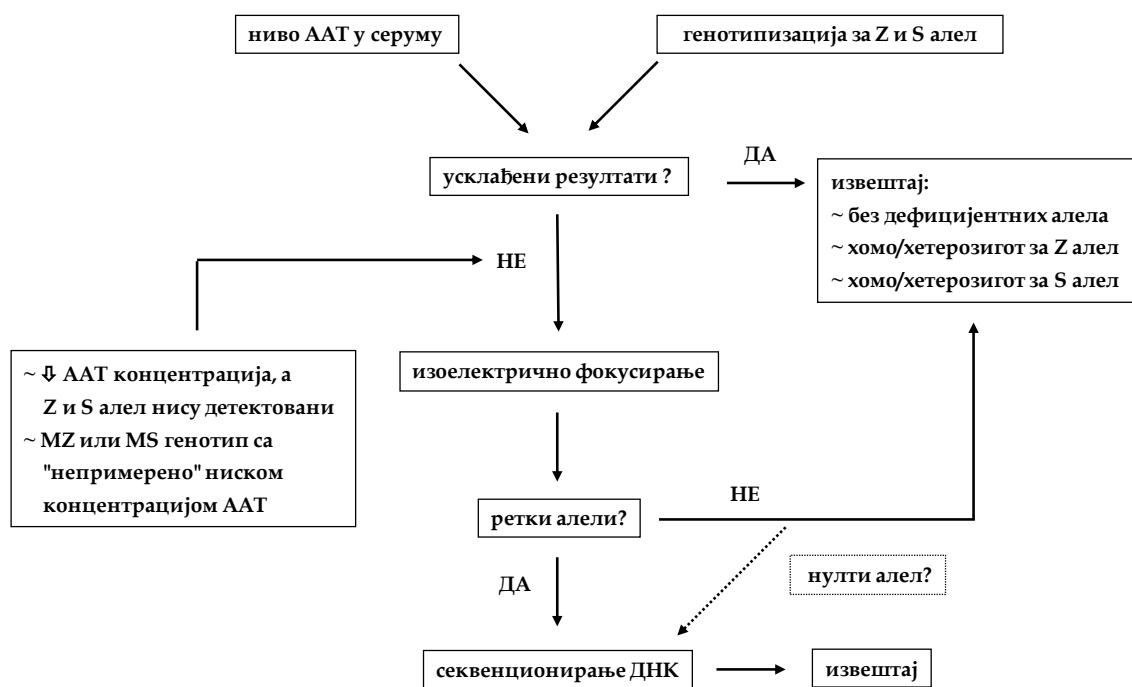
### 3. 7. Одређивање концентрације витамина B<sub>12</sub>

Концентрација витамина B<sub>12</sub> је одређивана у серуму методом двостепене СМИА. Након претретмана, дејством алфа монотиоглицерола и кобинамид дицијанида у алкалној средини, долази до везивања витамина B<sub>12</sub> за молекуле интринзичног фактора којим су обложене микрочестице. У следећем кораку се у реакциони систем додаје акридијумом обележени коњугат витамина B<sub>12</sub> који преко интринзичног фактора остварује везу са преосталим микрочестицама тј. онима које нису "заузете" молекулима витамина B<sub>12</sub> из узорка. Додатком одговарајућих реагенаса изазива се појава хемилуминисценције чији је интензитет обрнуто пропорционална концентрацији витамина B<sub>12</sub> у серуму.

Коришћен је комерцијални сет реагенаса (B12, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany) на анализатору ARCHИТЕСТ® ci8200 Integrated System, истог произвођача. Према подацима произвођача реагенаса коришћена метода има "within run" CV 2,7–5,6% одн. укупни CV 3,4–6,8%, границу детекције од 125,0 ng/L и опсег мерења од 146 до 2000 ng/L. Опсег референтних вредности износи од 187 и 883 ng/L. У складу са разматрањима у уводном делу, при испитивању поузданости ННсу као биомаркера дефицијенција витамина B<sub>12</sub>, као cut-off вредности су коришћене концентрације од од 203 и 473 ng/L.

### 3. 8. Испитивање присуства AATD

Лабораторијски протокол заснован на интегративној примени биохемијских и молекуларно-биолошких метода, примењен за испитивање присуства AATD шематски је приказан на Слици 3. "Прву линију" лабораторијске дијагностике представља истовремено одређивање концентрације AAT у крви и генотипизација у смислу потврде присуства Z и S алела. Уколико су налази концентрације и генотипа усклађени, може се закључити да ли је испитаник хомо- или хетерозиготни носилац клинички најзначајнијих алела. Дискрепантни резултати, попут концентрације AAT испод 0,9 g/L без доказаног присуства најчешћих дефицијентних алела или налаз хетерозиготног присуства Z или S алела праћен неочекивано ниском AAT (мања од 0,61 g/L за MZ односно испод 0,84 g/L за MS генотип), могу бити узроковани стеченим недостатком или присуством ретких алела.



Слика 3. Алгоритам за испитивање AATD (преведено из (142)).

Следећи корак у дијагностичком алгоритму је примена изоелектричног фокусирања (ИЕФ) као "reflex" теста који може указати на узрок неслагања. Уколико изглед "pattern"-а трака у гелу након ИЕФ укаже на присуство неких од ретких алела, његова идентификација се врши секвенцирањем ДНК. Такође, секвенцирање је индиковано применити и у случају сумње на присуство нултих алела (142).

### 3. 8. 1. Одређивање концентрације ААТ

Концентрација ААТ је одређивана у серуму методом имунонефелометрије. Метода се заснива на стварању имунских комплекса између молекула ААТ и анти-ААТ антитела. Интензитет светлости расуте услед њиховог присуства директно је пропорционалан концентрацији ААТ у узорку.

За одређивање је коришћен комерцијални реагенс (N Antiserum to Human  $\alpha$ 1-Antitrypsin, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) на нефелометру Siemens Dade Behring Nephelometer Analyzer II<sup>®</sup>, истог произвођача. Према подацима произвођача реагенаса коришћена метода има "within run" CV 2,7–4,5% одн. укупни CV 3,1–4,7%, границу детекције од 0,021 g/L и опсег мерења до 0,16–5,20 g/L. Опсег референтних вредности је између 0,9 и 2,0 g/L.

### 3. 8. 2. Молекуларна анализа присуства Z и S алела

Анализе су вршене на узорцима ДНК, методом заснованом на реакцији ланчаног умножавања полимеразом (PCR) и реверзној хибридизацији са алел-специфичним олигонуклеотидима (rASO). Поред комерцијалног сета реагенаса "GenoType<sup>®</sup> ААТ" (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) коришћени су и PCR пуфер, MgCl<sub>2</sub> и ДНК полимераза, набављени од произвођача Affymetrix UK Ltd (High Wycombe, United Kingdom).

Однос компоненти приликом припреме смеше за PCR реакцију као и остали услови анализе су већ описани у одељку 3.5. Метода за молекуларну анализу присуства Z и S алела је раније оптимизирана (143).

### 3. 8. 3. Фенотипизација ААТ

Фенотипизација ААТ је вршена у узорцима серума, методом изоелектричног фокусирања на полиакриламидном гелу у рН градијенту од 4 до 5. "Pattern" који указује на хомозиготно присуство функционалних алела садржи 2 главне и 3 "пратеће" протеинске фракције. У случају присуства дефицијентних алела, промењена је покретљивост појединих фракција или неке од њих нису видљиве.

Коришћени су комерцијални полиакриламидни гелови (Т=5%, С=3%; 245 x 110 x 1 mm) (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Као анодни раствор коришћена је  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1 mol/L), а као катодни L-глицин (1 mol/L). Линију за ИЕФ су сачињавали 2197 Power Supply, 2117 MULTIPHOR II Electrophoresis Unit и 2219 MULTITEMP II Thermostatic circulator (LKB Vertriebs GmbH, Vienna, Austria). ИЕФ је извођено при напону од 1400 V, јачини струје од 50 mA и температури од 10 °C. Након префокусирања од једног часа, наношено је 20  $\mu\text{L}$  узорка серума и ИЕФ настављано у наредна два часа.

За фиксирање, бојење и одбојавање гелова након ИЕФ коришћени су следећи раствори:

- фиксирање: трихлор сирћетна (0,72 mol/L) и сулфосалицилна киселина (0,16 mol/L) у дестилованој води.
- одбојавање: етанол (4,00 mol/L) и сирћетна киселина (1,37 mol/L) у дестилованој води. Пре коришћења раствор је неопходно загрејати на 60 °C.
- бојење: Coomassie brilliant blue G-250 (3,75 g/L) у раствору за одбојавање.

Након ИЕФ гелови су фиксирани 45 минута, бојени 10 минута и одбојавани током 48 часова. Фенотип је одређиван поређењем положаја карактеристичних трака са распоредом добијеним анализом узорка са познатим фенотипом. За поређење су коришћени комерцијални узорци који су садржавали хомозиготне и хетерозиготне комбинације М, Z и S алела (Sebia, Evry Cedex, France). Фенотип је независно идентификован од стране две особе.

#### 3. 8. 4. Секвенцирање SERPINA1 гена

SERPINA1 ген је директно секвенциран, коришћењем ABI Prism BigDye Terminator Kit v3.1 Cycle Sequencing Kit на апарату ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, према упутствима произвођача (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific brand of Waltham, Massachusetts, USA). За анализу добијених података је коришћен Sequencing Analysis Software v5.2 Patch програмски пакет. Секвенца коришћених прајмера (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, USA) је приказана у Табели III.

*Табела III Прајмери коришћени за секвенционирање SERPINA1 гена.*

	Прајмери
Егзон 2	5'-TGTC AATCCCTGATCACT-3' 5'-TTGCTTGTTTCTATGGGAAC-3'
Егзон 3	5'-GGTTTCTTTATTCTGCTACA-3' 5'-TCAGTCCCAACATGGCTAA-3'
Егзон 4	5'-GGCAGAAATAATCAGAAAAG -3' 5'- TGGTATCTGTAGGGAAGA -3'
Егзон 5	5'- GTGACAGGGAGGGAGAGGA -3' 5'-GGAGGGATTTACAGTCACAT-3'

### 3. 9. Одређивање концентрације CRP

Концентрација CRP је одређивана у серуму имунонефелометријски. Принцип методе се заснива на агрегацији полистиренских честица обложених моноклонским анти-CRP антителима приликом мешања са узорком који садржи CRP. Интензитет светлости расуте приликом проласка кроз тако насталу смешу директно је пропорционалан концентрацији CRP у узорку.

За одређивање је коришћен комерцијални реагенс (CardioPhase® hsCRP, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) на нефелометру Siemens Dade Behring Nephelometer Analyzer II®, истог произвођача. Према подацима произвођача реагенаса коришћена метода има "within run" CV 2,1–4,6% одн. укупни CV 2,2–5,8%, границу детекције од 0,2 mg/L и опсег мерења до 55,7 mg/L. Референтни опсег је до 3,0 mg/L.

### 3. 10. Статистичка обрада података

Расподела квантитативних података је тестирана Shapiro-Wilk тестом, а значајност разлике Студент t, Kruskal-Wallis и Mann-Whitney U тестом, без и са Boniferroni корекцијом. За поређење категоричких података коришћени су Chi-square, Fisher exact и McNemar Chi-square са exact-P тестови. Међузависност варијабли је тестирана Spearman непараметарском корелацијом. Значај испитиваних фактора као предиктора концентрације Hcy анализиран је мултиплом регресионом анализом, док је за њихову процену у смислу фактора ризика за настанак HNCy коришћена логистичка регресиона анализа. За процену поузданости концентрације Hcy као предиктора дефицијенције фолата и витамина B12 коришћена је Receiver Operating Characteristic ROC анализа. Статистичка значајност је била дефинисана P вредношћу мањом од 0,05.

За статистичку анализу коришћен је статистички програм SPSS® (IBM®, New York, USA) верзије 20.0 и 22.0.

## 4. Резултати

### 4. 1. Концентрација Нсу и учесталост ННсу

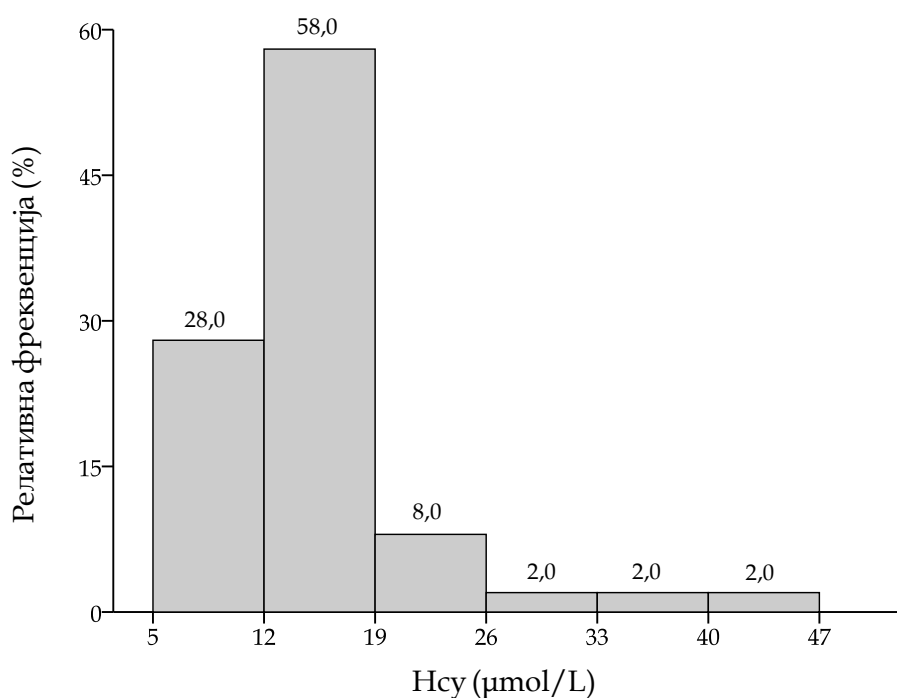
Вредности концентрације Нсу добијене у испитиваним групама приказане су у Табели IV.

Табела IV Вредности концентрације Нсу

Нсу ( $\mu\text{mol/L}$ )	Болесници	Контролна група
$\bar{x}$ (SD)	14,65 (6,37)	10,87 (4,36)
Медијана (Me)	13,22	9,80
Распон (мин.-макс.)	5,92–40,22	5,30–30,90
Интерквартилни распон (IQR)	11,48–16,08	8,55–11,92

Пре тестирања разлика у концентрацији Нсу између болесника и контролне групе проверено је да ли се групе разликују у старости и заступљености мушкараца и жена, као и да ли је расподела добијених вредности Гаусовог типа. Коришћењем Студент t теста закључено је да нема статистички значајне разлике ( $P=0,478$ ) у старости између оболелих и контролне групе. Исто је закључено за заступљеност мушкараца и жена у групи болесника (28 мушкараца/22 жене) и контролној групи (20 мушкараца/28 жена), када је упоређивање вршено Chi-square тестом ( $P=0,165$ ). Расподела вредности концентрације Нсу у групи болесника је приказана на Слици 4. Shapiro-Wilk тест је показао да дистрибуција не прати Гаусову расподелу ( $P<0,001$ ).

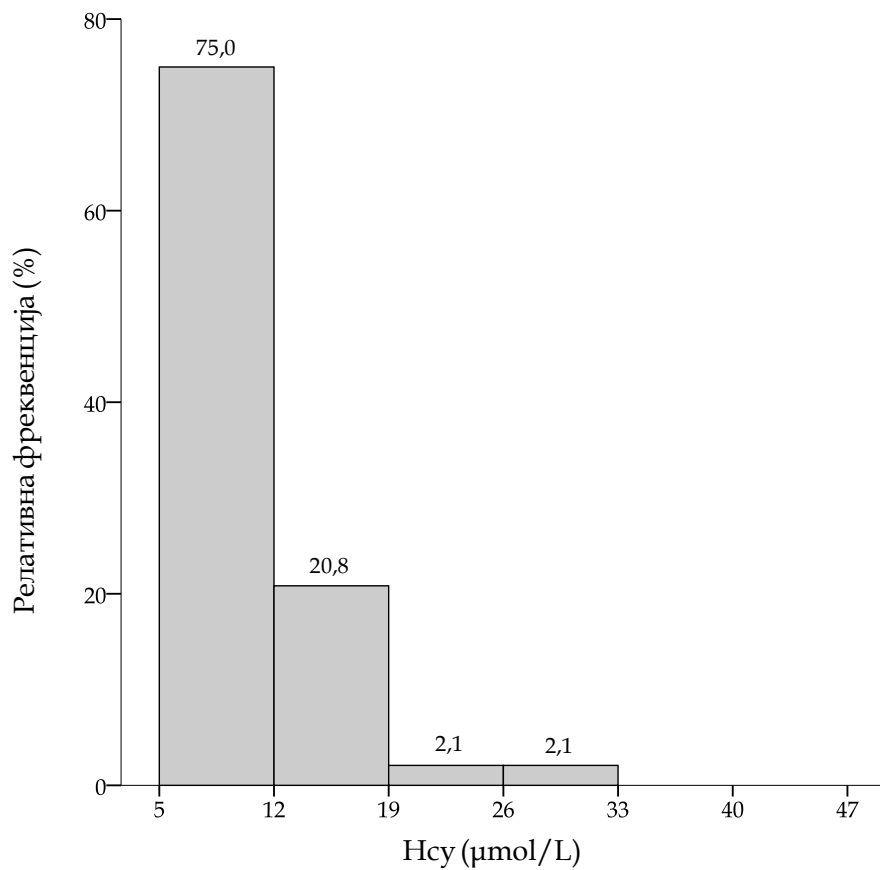




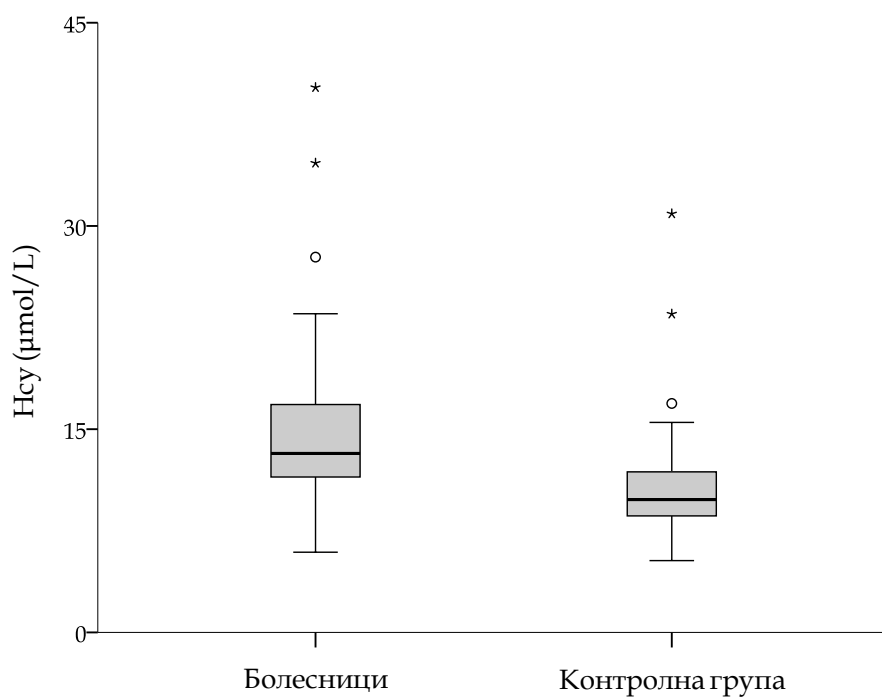
Слика 4. Расподела вредности концентрације Нсу у групи болесника.

На Слици 5 приказана је расподела вредности концентрације Нсу у контролној групи. Слагање са Гаусовом расподелом је проверено Shapiro-Wilk тестом и доказано је да постоје значајна одступања ( $P < 0,001$ ). Екстремне вредности нису одбациване с обзиром да је распон између њих и њима најближих вредности био мањи од 0,33 у односу на укупан распон вредности (144).

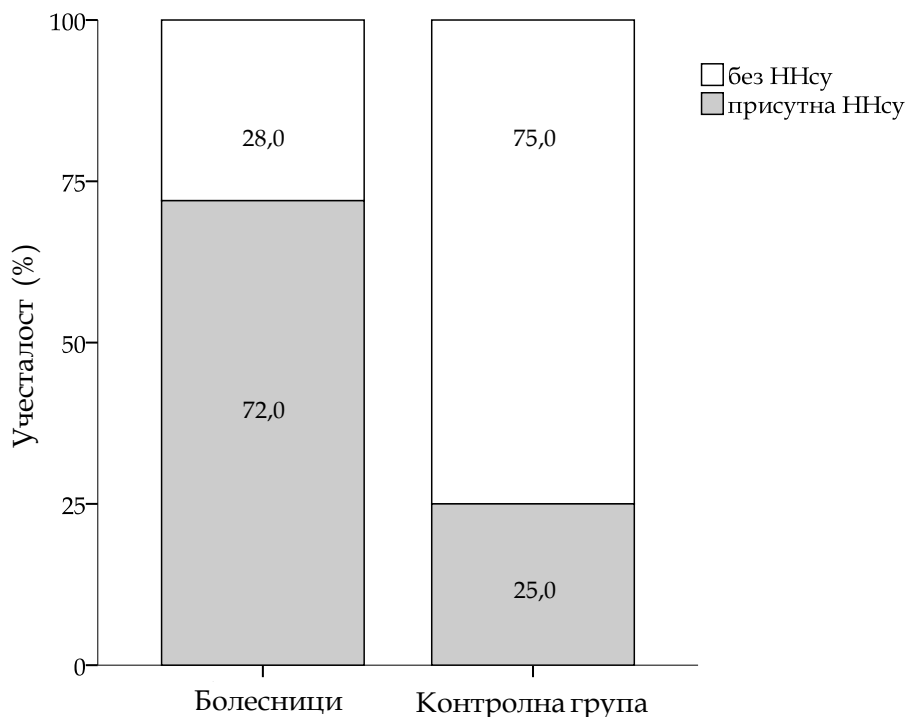
Концентрација Нсу у испитиваним групама у облику Box-and-Whisker графика приказана је на Слици 6. Вредност медијане је код групе болесника била за  $3,42 \mu\text{mol/L}$  већа у односу на контролну групу, што је представљало статистички значајну разлику ( $P < 0,001$ ). Са Слике 7 се уочава да је инциденца ННсу међу оболелима била за 47% већа него међу испитаницима у контролној групи. Уочена разлика је такође била статистички значајна ( $P < 0,001$ ). Odds ratio са интервалом поузданости од 95% (OR (95% CI)) је износио 3,889 (1,677–9,017) што је указивало да је ХОБП значајан фактор ризика за појаву ННсу ( $P = 0,002$ ).



Слика 5. Расподела вредности концентрације Нсу у контролној групи.



Слика 6. Нсу код болесника и у контролној групи.



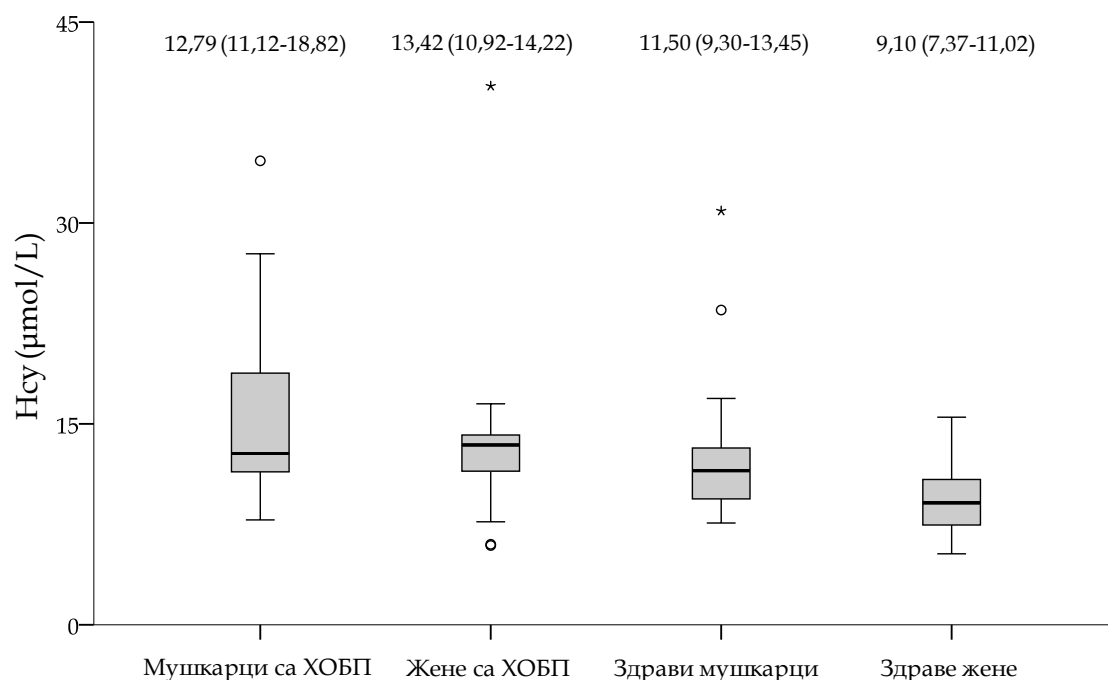
Слика 7. Учесталост H<sub>2</sub>S код болесника и у контролној групи.

Такође, између Ме (IQR) вредности концентрације H<sub>2</sub>S добијене код амбулантних (13,05 (10,83–17,79)  $\mu\text{mol/L}$ ) и хоспитализованих болесника (13,38 (11,47–14,39)  $\mu\text{mol/L}$ ) није било статистички значајне разлике ( $P=0,680$ ). Приликом аналогног поређења између болесника са радиографски доказаним емфиземом (12,74 (10,54–17,82  $\mu\text{mol/L}$ ) и без овог налаза (13,47 (11,47–16,82)  $\mu\text{mol/L}$ ) добијен је исти закључак ( $P=0,976$ ).

#### 4. 2. Утицај пола

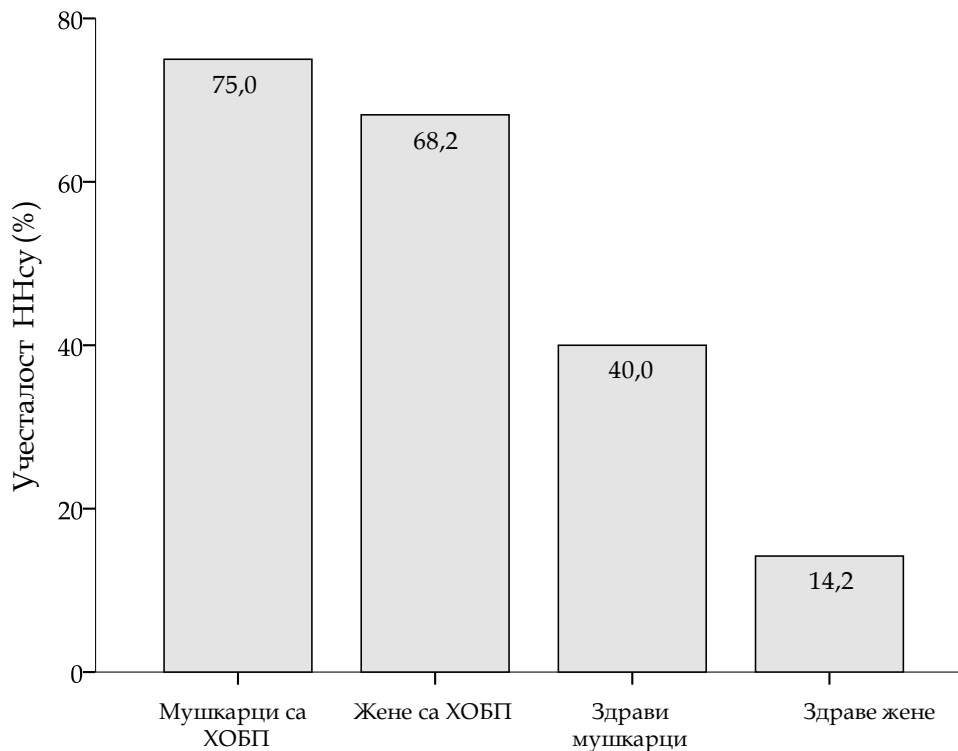
На Слици 8 су приказане концентрације H<sub>2</sub>S код мушкараца и жена. Разлика између вредности код болесника мушког и женског пола није била статистички значајна ( $P=0,282$ ), док су у контролној групи мушкарци имали значајно веће вредности H<sub>2</sub>S ( $P=0,005$ ) од жена. Концентрација H<sub>2</sub>S је била значајно већа ( $P=0,019$ ) код мушкараца оболелих од ХОБП у односу на здраве. Такође, значајна разлика у

концентрацији Нсу је уочена између женских болесника и испитаника женског пола у контролнј групи ( $P=0,003$ )



Слика 8. Нсу код мушкараца и жена - Me (IQR) и Box-and-Whisker график.

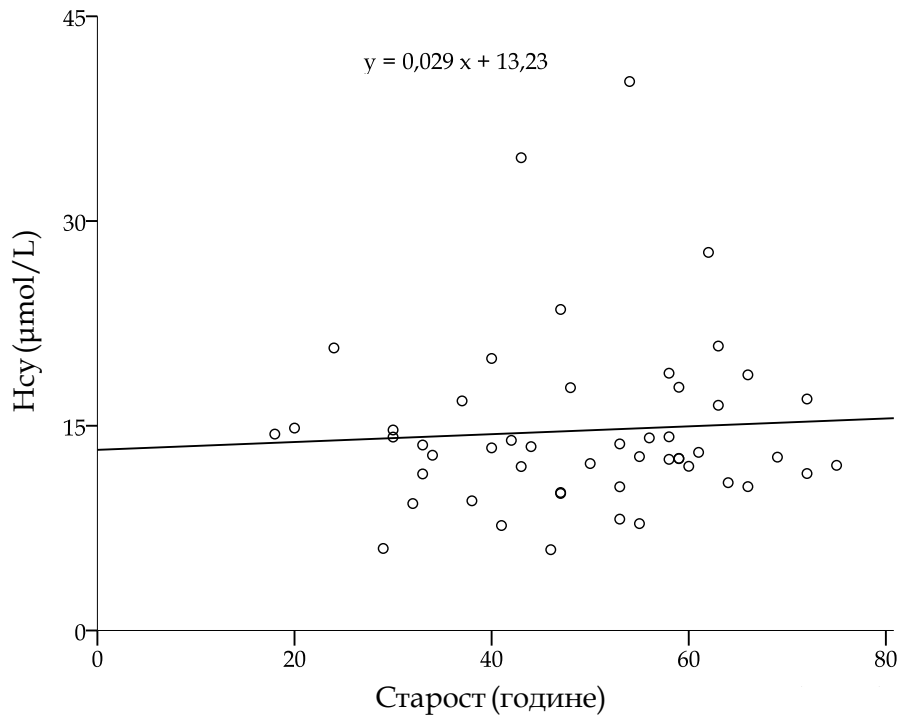
Учесталост ННсу код мушкараца и жена је приказана на Слици 9. Разлика између полова није била значајна код оболелих ( $P=0,753$ ) као ни код контрола ( $P=0,088$ ). Учесталост је била виша ( $P=0,019$ ) код мушкараца са ХОБП у односу на здраве, као и код болесница у поређењу са женама у контролној групи ( $P<0,001$ ). Применом логистичке регресионе анализе за мушки пол као фактор ризика за настанак ННсу у групи оболелих, израчуната је вредност OR од 1,167 (0,346–3,933) која није била статистички значајна ( $P=0,804$ ).



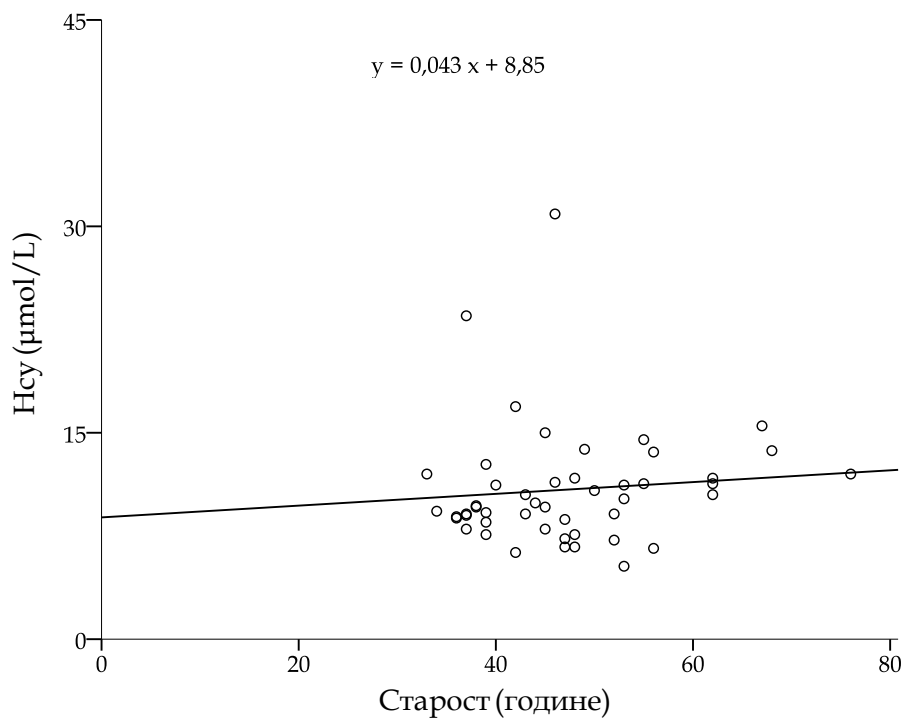
Слика 9. ННсу код мушкараца и жена.

#### 4. 3. Утицај старости

Повезаност старости и концентрације Нсу је графички приказана на Сликама 10 и 11. Spearman-ов коефицијент корелације ( $\rho_s$ ) од 0,039 у групи болесника није указивао на значајну повезаност ( $P=0,786$ ). За контролну групу израчунат је  $\rho_s$  од 0,199, који такође није био статистички значајан ( $P=0,175$ ). У циљу процене значаја старости као фактора ризика за ННсу болесници су подељени у две групе: млађи и старији од 50 година. Вредности Нсу код млађих (13,43 (10,09–14,72)  $\mu\text{mol/L}$ ) и старијих (12,90 (12,13–16,84)  $\mu\text{mol/L}$ ) болесника се нису статистички значајно разликовале ( $P=0,470$ ). Старост изнад 50 година као фактор ризика за ННсу код оболелих од ХОБП је имала OR од 0,561 (0,164–1,918), који се није показао значајним ( $P=0,357$ ).



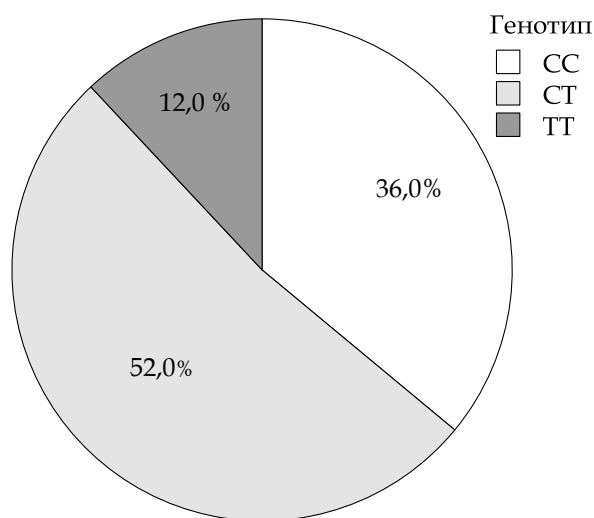
Слика 10. Корелација старости и концентрације Hcy у групи болесника.



Слика 11. Корелација старости и концентрације Hcy у контролној групи.

#### 4.4. Учесталост полиморфизама MTHFR C677T и A1298C и утицај на концентрацију Hcy

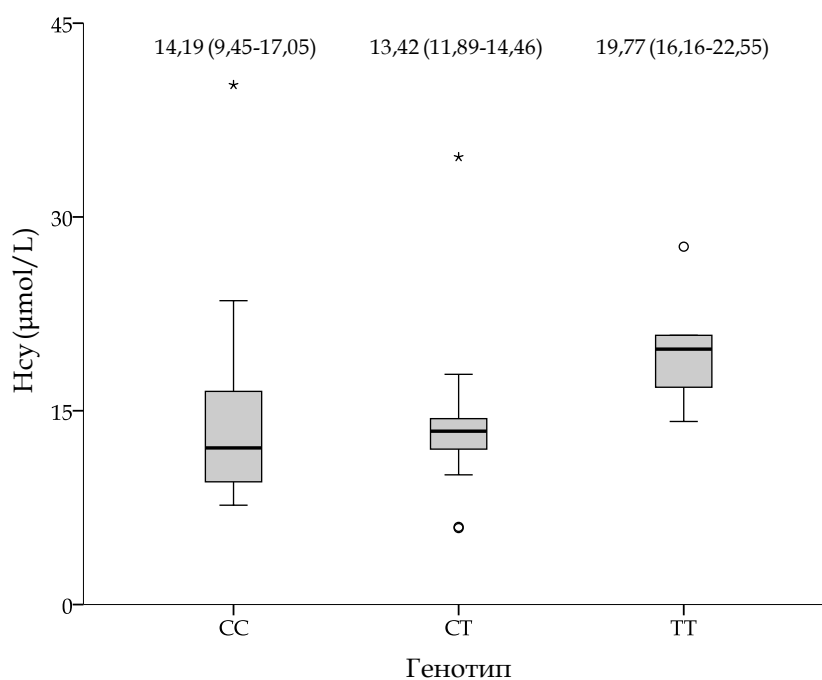
Расподела MTHFR C677T генотипова у групи болесника, графички представљена на Слици 12, је била у Hardy Weinberg-овој равнотежи ( $P=0,549$ ). Фреквенције алела су износиле 62,2% за С и 37,8% за Т алел.



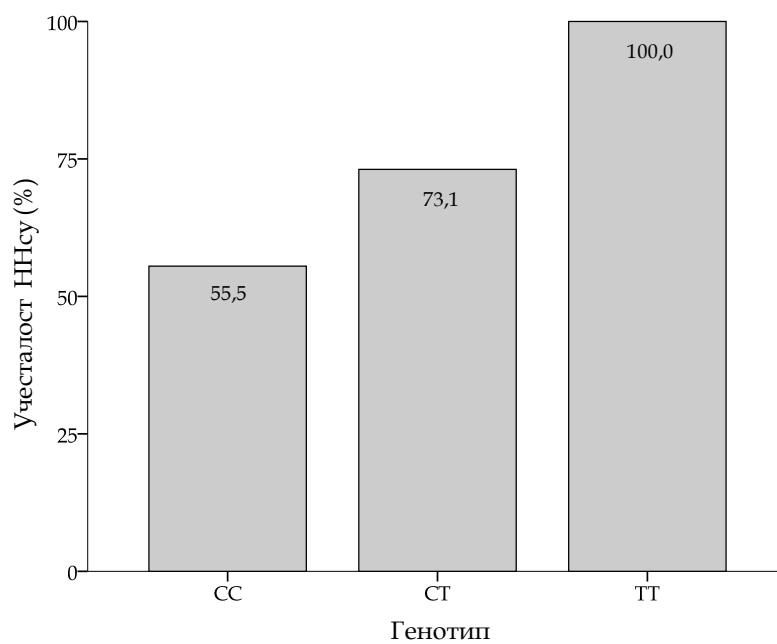
Слика 12. Расподела MTHFR C677T генотипова у групи болесника.

Фреквенције генотипова се нису значајно разликовале од оних добијених у контролној групи: 39,6% за CC, 36,2% за CT и 24,2% за TT ( $P=0,669$ ). Концентрације Hcy измерене код болесника са различитим MTHFR C677T генотиповима су приказане на Слици 13. Разлике између генотипова CC и TT односно CT и TT су биле статистички значајне ( $P=0,012$  за CC/TT тј.  $P=0,002$  за CT/TT), док поређење између CC и CT генотипа није упућивало на овакав закључак ( $P=0,223$ ). Премда постоји тренд повећане учесталости HHcy између генотипова, што је приказано на Слици 14, није доказана његова статистичка значајност ( $P=0,111$ ). OR за присуство Т алела као фактора ризика за HHcy болесника са ХОБП од 2,857 (0,899–9,989) није био статистички значајан ( $P=0,100$ ). Значај MTHFR 677 TT генотипа као

фактора ризика за ННсу није могао бити процењен израчунавањем OR јер је учесталост ННсу у групи са овим генотипом износила 100%



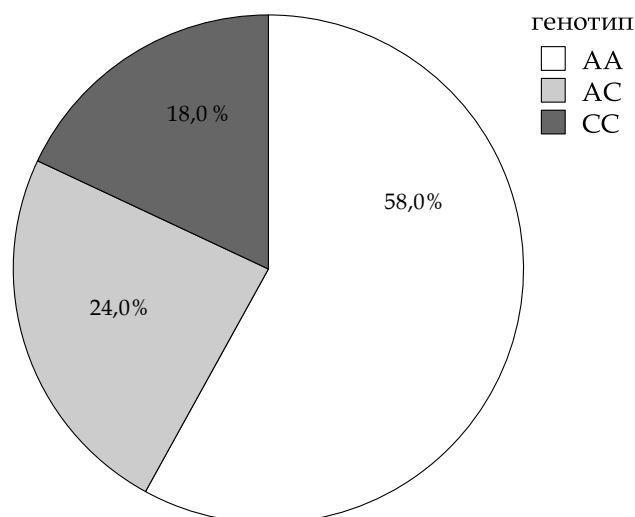
Слика 13. Генотипови MTHFR C677T и ниво Нсу у групи болесника-Ме (IQR) и Box-and-Whisker график.



Слика 14. Генотипови MTHFR C677T и учесталост ННсу у групи болесника.



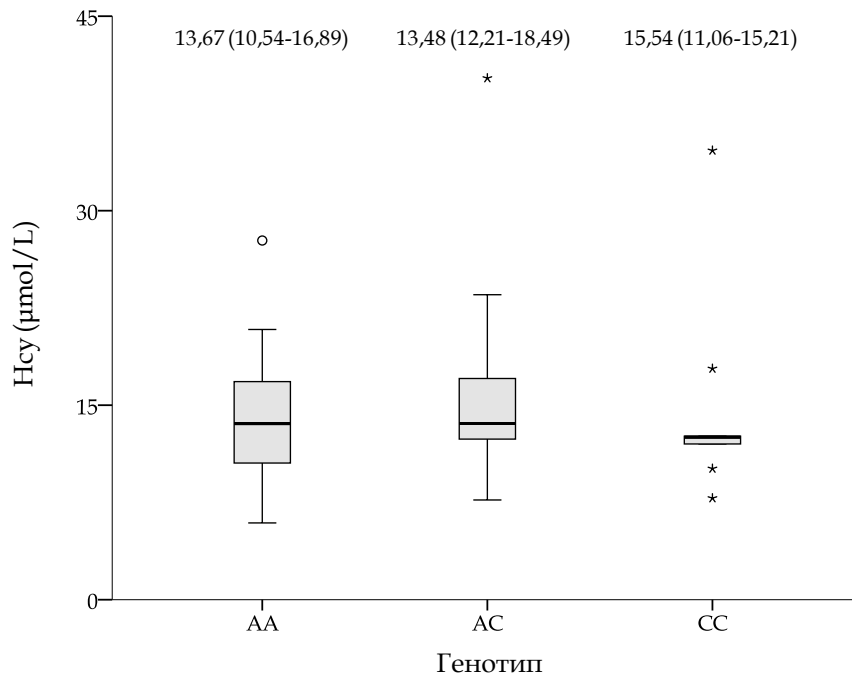
Расподела МТНFR А1298С генотипова у групи болесника је графички представљена на Слици 15. Алелне фреквенције су износиле 70,0% за А и 30,0% за С. Уочено је одступање од Hardy Weinberg-ове равнотеже ( $P=0,024$ ).



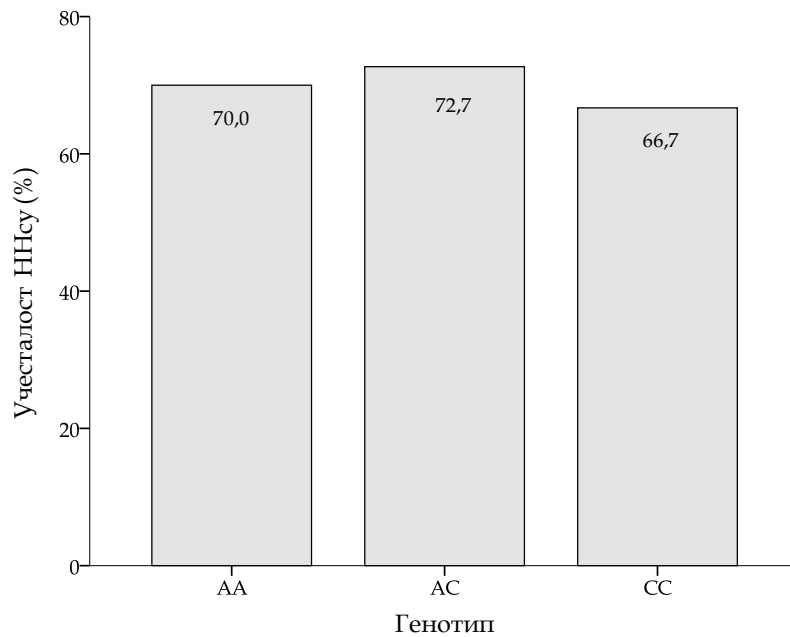
Слика 15. Расподела МТНFR А1298С генотипова у групи болесника .

Концентрације Нсу измерене код болесника са различитим МТНFR А1298С генотиповима су приказане на Слици 16. Није доказано да су разлике између њих статистички значајне ( $P=0,610$ ). Аналогно, ни учесталост ННсу се није значајно разликовала ( $P=1,000$ ) међу болесницима са различитим МТНFR А1298С генотиповима (Слика 17). OR за присуство С алела као фактора ризика за ННсу код оболелих је износио 0,583 (0,172–1,974) и није био статистички значајан ( $P=0,386$ ). Утицај комбинованог присуства МТНFR 677 Т и МТНFR 1298 С алела је испитан поређењем концентрација Нсу и учесталости ННсу између болесника који су имали оба поменуто алела у генотипу (6 са хаплотипом 677 СТ/1298 АС, 2 са 677 СТ/1298 СС и 1 са 677 СС/1298 АС) и оних у чијем је генотипу био присутан само један од њих. Резултати, приказани у Табели V, нису

указали на значајну разлику у нивоу Нсу ( $P=0,174$ ) ни учесталости ННсу ( $P=0,705$ ).



Слика 16. Генотипови MTHFR A1298C и ниво Нсу у групи болесника-Ме (IQR) и Box-and-Whisker график.



Слика 17. Генотипови MTHFR A1298C и учесталост ННсу у групи болесника.

Табела V Утицај комбинованог присуства MTHFR 677 T и MTHFR 1298 C алела на концентрацију Hcy и учесталост HHcy у групи болесника.

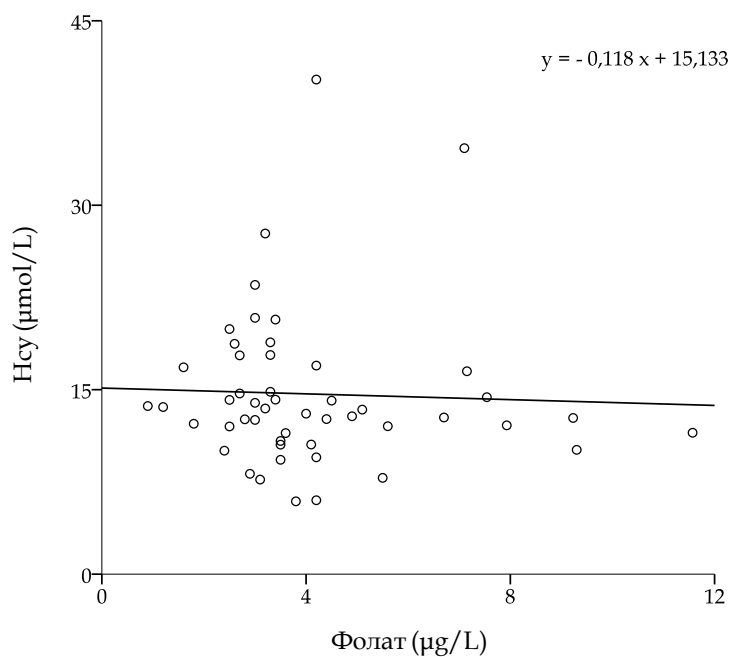
	Комбиновано присуство	Без комбинованог присуства
Hcy (Me (IQR))	13,59 (12,38–40,22)	12,84 (10,54–16,89)
Удео болесника са HHcy	7/9	28/41

У случају комбинованог присуства MTHFR 677 T и MTHFR 1298 C алела OR вредности су износиле 2,705 (0,677–10,806) за T односно 0,882 (0,222–3,497) за C алел. Наведене вредности нису биле статистички значајне ( $P=0,159$  за T односно  $P=0,858$  за C алел).

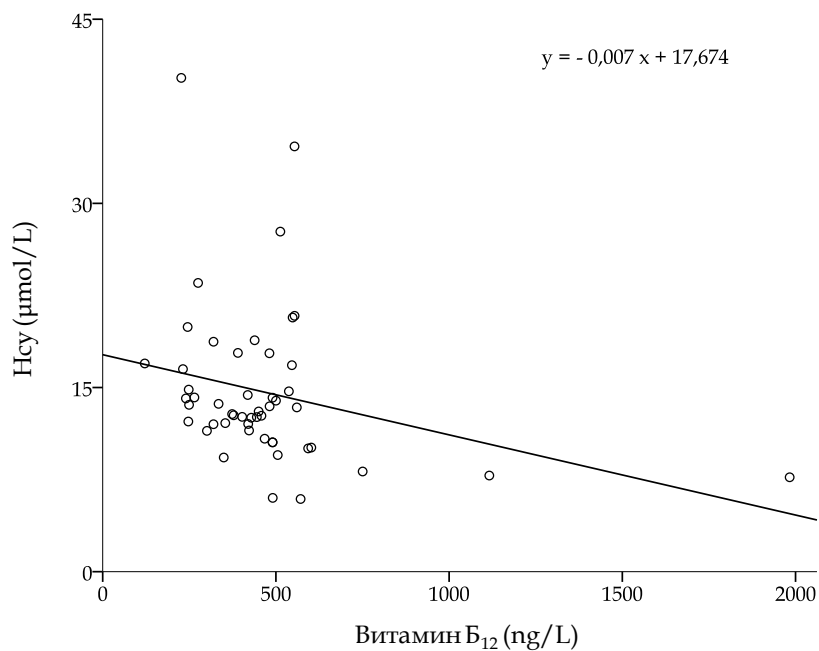
#### 4.5. Утицај концентрације фолата и витамина B<sub>12</sub>

Слагање са Гаусовом расподелом је показано за вредности концентрација фолата ( $P=0,200$ ) и витамина B<sub>12</sub> ( $P=0,200$ ) у испитиваној групи болесника. Средње вредности (SD) су износиле 4,13 (2,16)  $\mu\text{g/L}$  за фолат односно 463,6 (271,0)  $\text{ng/L}$  за витамин B<sub>12</sub>. Концентрација фолата (Me (IQR)) измерена код мушких болесника 3,40 (2,92–4,52)  $\mu\text{g/L}$  није била значајно различита ( $P=0,311$ ) у поређењу са вредношћу добијеном код женских 3,55 (2,92–4,42)  $\mu\text{g/L}$ . Аналогно, између нивоа витамина B<sub>12</sub> код мушкараца 433,7 (345,4–521,1)  $\text{ng/L}$  и жена 447,5 (309,3–497,8) са ХОБП није доказана статистички значајна разлика ( $P=0,325$ ). Вредност  $\rho_s$  од 0,279 је указивала на статистички значајну повезаност старости болесника и нивоа фолата ( $P=0,047$ ). За корелацију између година оболелих и концентрације витамина B<sub>12</sub> израчунат је  $\rho_s$  од  $-0,103$ , који није био статистички значајан ( $P=0,477$ ).

Повезаност нивоа фолата односно витамина B<sub>12</sub> и Нсу код испитиваних болесника је графички приказана на Сликама 18 и 19.

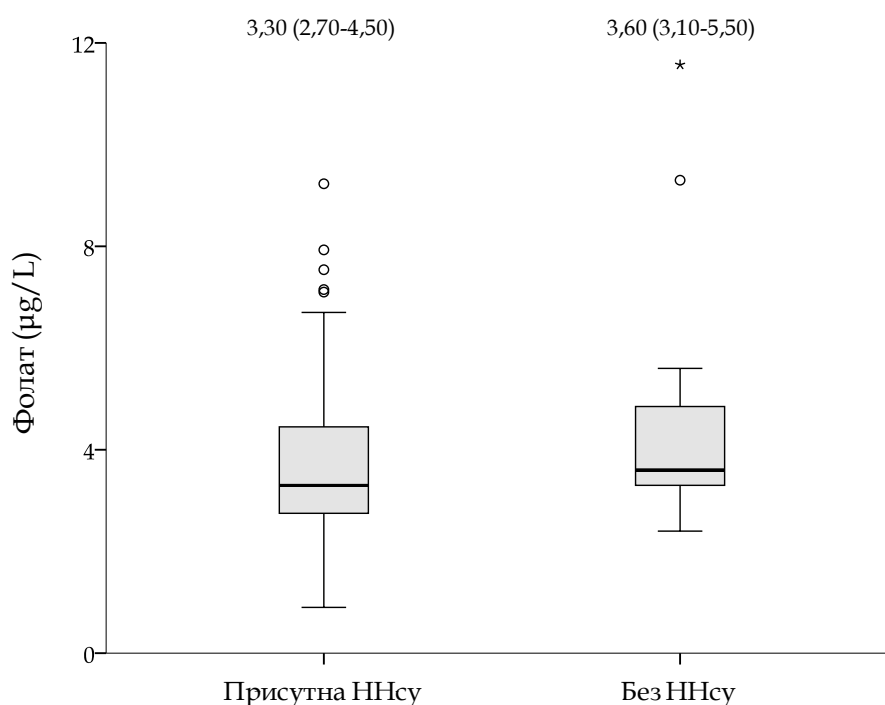


Слика 18. Корелација концентрација фолата и Нсу код испитиваних болесника.

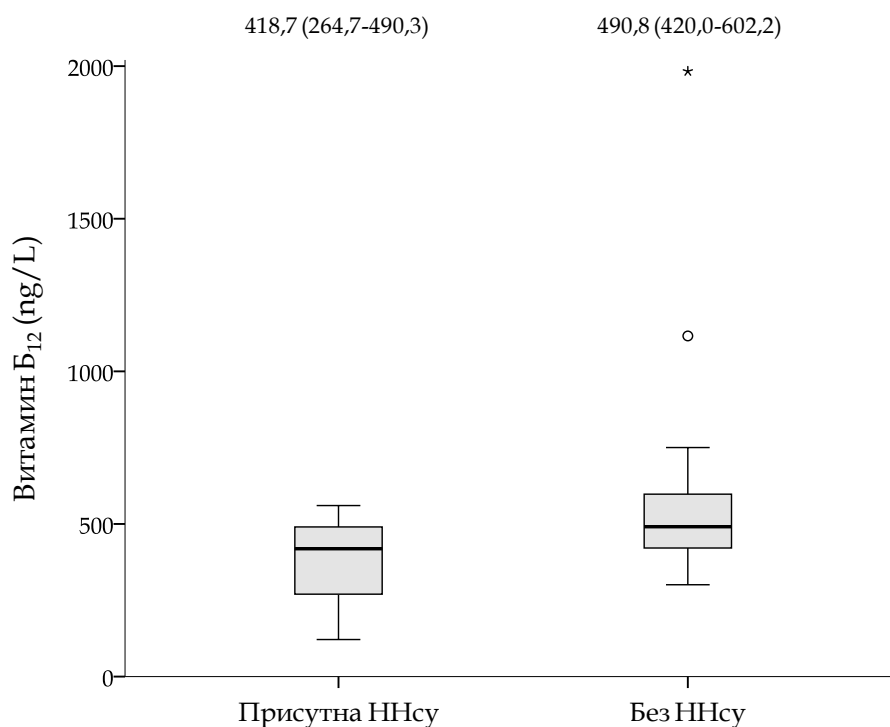


Слика 19. Корелација концентрација витамина B<sub>12</sub> и Нсу код испитиваних болесника.

Вредност  $\rho_s = -0,138$  за корелацију Нсу са фолатом није указивала на статистички значајну повезаност ( $P=0,340$ ). Међутим, корелација нивоа Нсу и витамина Б12, окарактерисана са  $\rho_s$  од  $-0,310$ , је била статистички значајна ( $P=0,029$ ). Концентрације фолата и витамина Б12 код болесника са ННсу и оних код којих се она није појавила су приказане на Сликама 20 и 21. Док разлике у нивоу фолата нису биле статистички значајне ( $P=0,281$ ), показано је да су болесници код којих је дошло до развоја ННсу имали значајно ниже концентрације витамина Б12 у поређењу са онима који су имали концентрацију Нсу испод  $12,0 \mu\text{mol/L}$  ( $P=0,010$ ).

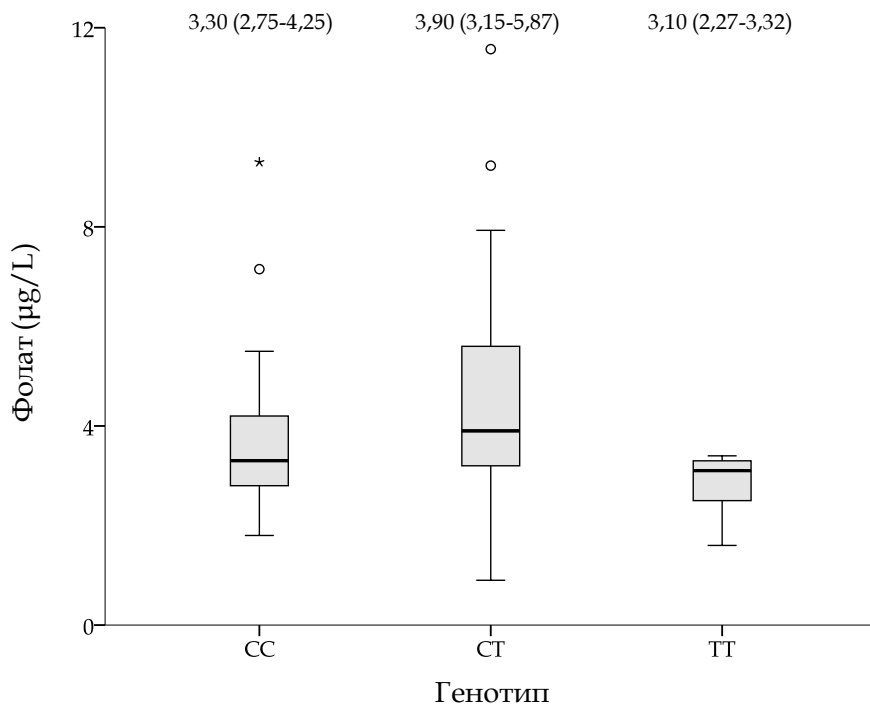


Слика 20. Присуство ННсу и ниво фолата код болесника - Ме (IQR) и Box-and-Whisker график.

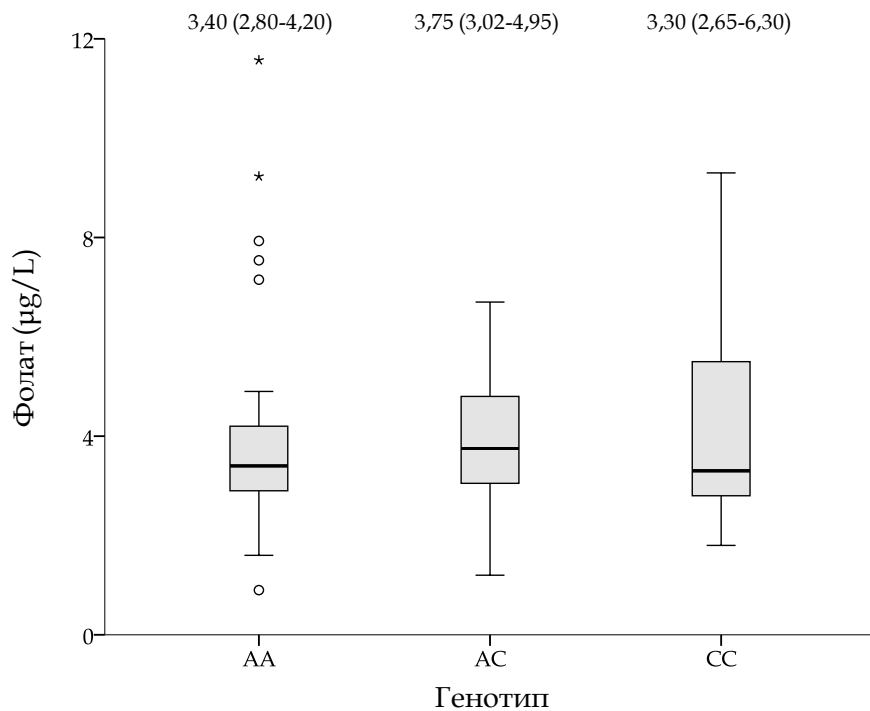


Слика 21. Присуство ННсу и ниво витамина Б<sub>12</sub> код болесника - Ме (IQR) и Box-and-Whisker график.

Појединачни утицај полиморфизама МТНFR С677Т и А1298С на концентрацију фолата код болесника је приказан на Сликама 22 и 23. Разлике у нивоу фолата између генотипова нису биле статистички значајне ( $P=0,096$  за МТНFR С677Т, односно  $P=0,921$  за МТНFR А1298С). Концентрација фолата је износила  $4,00$  ( $3,35-6,15$ )  $\mu\text{g/L}$  код болесника који су у генотипу имали и МТНFR 677 Т и 1298 С алела, односно  $3,30$  ( $2,75-4,30$ ) код оних где је само један од њих био присутан. Наведене концентрације се нису статистички значајно разликовале ( $P=0,274$ ).



Слика 22. MTHFR C677T генотипови и ниво фолата код болесника - Ме (IQR) и Box-and-Whisker график.



Слика 23. MTHFR A1298C генотипови и ниво фолата код болесника - Ме (IQR) и Box-and-Whisker график.

Као cut-off вредности за дефицијенцију фолата, приликом испитивања њеног значаја као фактора ризика за настанак ННсу код болесника коришћене су концентрације од 4,0, 6,6 и 8,0  $\mu\text{g/L}$ , изабране на основу литературних података (20–22). Учесталост ННсу и OR за поменуте вредности су приказане у Табели VI.

*Табела VI Учесталост ННсу и OR код различитих cut-off вредности коришћене за дефицијенцију фолата код испитиваних болесника.*

Cut-off ( $\mu\text{g/L}$ )	Учесталост ННсу (%)	OR (95%CI)	P
4,0	32,0	0,231 (0,045–1,184)	0,079
6,6	84,0	1,345 (0,239–7,577)	0,737
8,0	90,0	0,394 (0,050–3,098)	0,376

Генерално, разлике у учесталости ННсу између cut-off вредности су биле значајне ( $P < 0,001$ ). Детаљнија анализа је показала да овакав закључак треба приписати разликама када су као граничне коришћене концентрације од 4,0 и 8,0  $\mu\text{g/L}$  ( $P = 0,012$ ), с обзиром да значајност разлике није доказана приликом упоређивања концентрација 4,0 и 6,6  $\mu\text{g/L}$  ( $P = 0,100$ ) односно 6,6 и 8,0  $\mu\text{g/L}$  ( $P = 0,554$ ). Такође, неопходно је истаћи да ни за једну од испитиваних cut-off вредности није доказана статистичка значајност за OR вредност.

Приликом испитивања поузданости појаве ННсу као предиктора дефицијенције фолата код испитиваних болесника, испитане су концентрације Нсу од 10, 12 и 15  $\mu\text{mol/L}$ . Резултати Receiver Operating Characteristic (ROC) анализе, приказани у Табели VII, су показали да поузданост одређивања Нсу као маркера дефицијенције фолата није задовољавајућа.



Табела VII ROC анализа HHCy као предиктора дефицијенције фолата код испитиваних болесника.

Фолат cut-off ( $\mu\text{g/L}$ )	HHCy cut-off ( $\mu\text{mol/L}$ )	AUC	SE	95% CI	P
4,0	10	0,514	0,101	0,317–0,711	0,721
	12	0,556	0,103	0,354–0,757	0,584
	15	0,620	0,094	0,435–0,805	0,235
6,6	10	0,552	0,112	0,332–0,773	0,651
	12	0,603	0,113	0,382–0,824	0,375
	15	0,615	0,104	0,410–0,819	0,322
8,0	10	0,686	0,109	0,472–0,900	0,229
	12	0,661	0,139	0,389–0,933	0,298
	15	0,671	0,113	0,451–0,892	0,267

Приликом испитивања значаја дефицијенције витамина B<sub>12</sub> као фактора ризика за настанак HHCy, као cut-off вредности су коришћене концентрације од 203 и 473 ng/L, такође преузете из литературе (20–22). Учесталост HHCy и OR за поменуте вредности су приказане у Табели VIII. Разлике у учесталости HHCy између cut-off вредности су биле значајне (P<0,001), док за вредност OR није показана статистичка значајност.

Табела VIII Учесталост ННсу и OR за различите cut-off вредности коришћене за дефинисање дефицијенције витамина Б<sub>12</sub> код испитиваних болесника.

Cut-off (ng/L)	Учесталост ННсу (%)	OR (95%CI)	P
203	4,0	/*	/*
473	58,0	0,348 (0,100–1,210)	0,097

\*вредност није могла бити израчуната јер је већина болесника (48) имала ниво изнад cut-off-а.

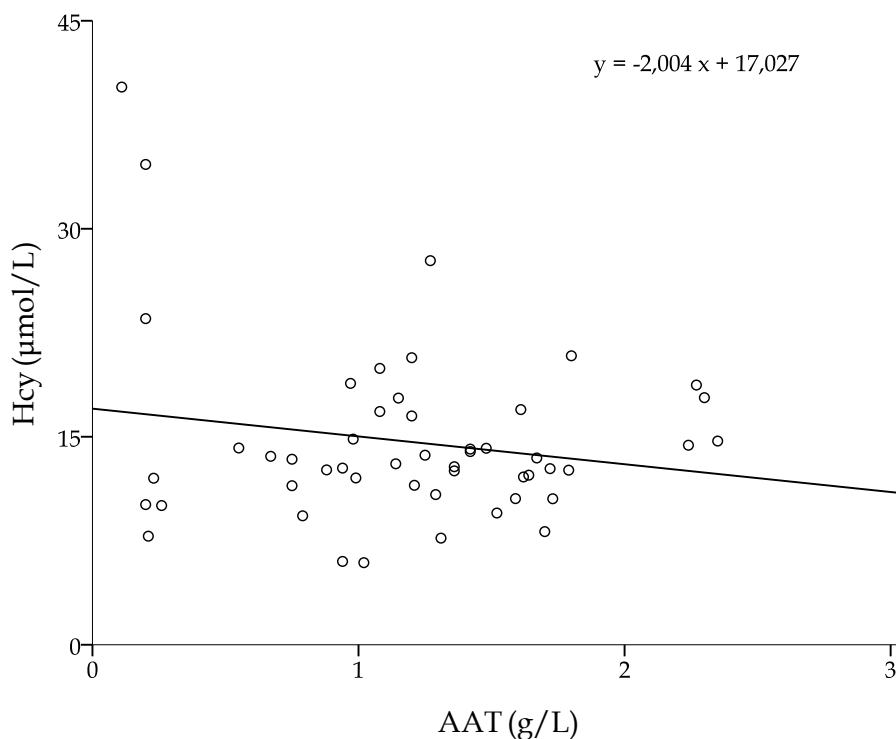
Приликом испитивања поузданости појаве ННсу као предиктора дефицијенције витамина Б<sub>12</sub> код испитиваних болесника, такође су испитане концентрације Нсу од 10, 12 и 15  $\mu\text{mol/L}$ . Резултати Receiver Operating Characteristic (ROC) анализе су приказани Табели IX. Показано је да поузданост одређивања Нсу као маркера дефицијенције витамина Б<sub>12</sub> није задовољавајућа.

Табела IX ROC анализа ННсу као предиктора дефицијенције витамина Б<sub>12</sub> код испитиваних болесника.

Витамин Б <sub>12</sub> cut-off (ng/L)	ННсу cut-off ( $\mu\text{mol/L}$ )	AUC	SE	95% CI	P
203	10	0,553	0,267	0,029–1,000	0,859
	12	0,632	0,224	0,193–1,000	0,657
	15	0,842	0,108	0,631–1,000	0,248
473	10	0,633	0,097	0,443–0,824	0,166
	12	0,671	0,094	0,487–0,854	0,076
	15	0,504	0,096	0,316–0,693	0,965

#### 4.6. Повезаност са ААТD

Повезаност концентрација ААТ и Нсу код болесника је графички приказана на Слици 24. Корелација, окарактерисана са  $\rho_s$  од  $-0,046$ , није показала статистичку значајност ( $P=0,750$ ).



Слика 24. Корелација концентрација ААТ и Нсу код испитиваних болесника

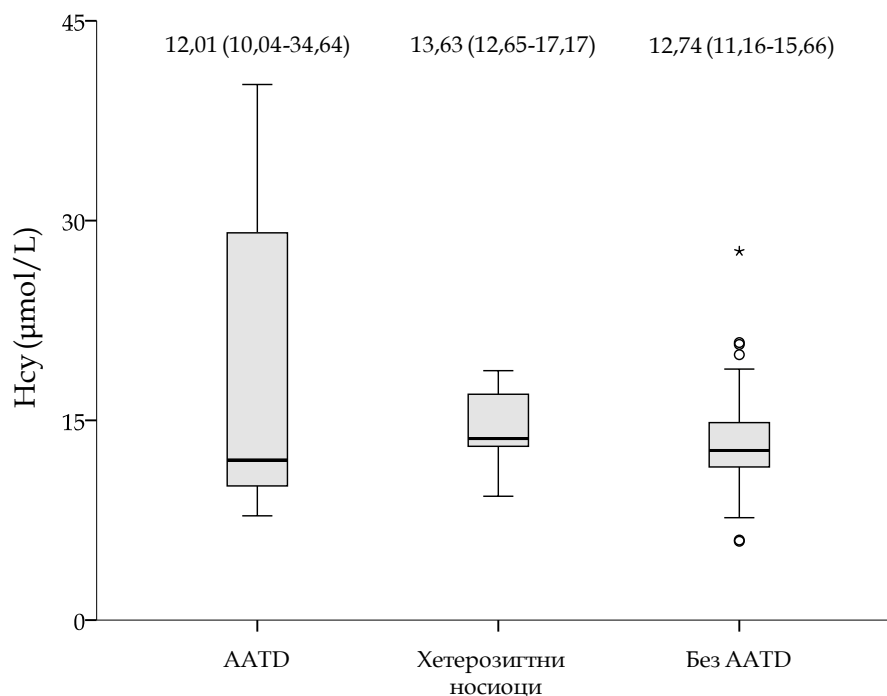
Применом интегративног лабораторијског алгоритма присуство ААТD је откривено код 7 испитиваних болесника. Њих пет су били хомозиготни носиоци Z алела, док је код двоје доказано комбиновано хетерозиготно присуство Z и ретких алела,  $M_{malton}$  и  $Q0_{amersfoort}$ . За укупно 10 болесника, 8 са MZ и 2 са MS генотипом је показано да су хетерозиготни носиоци ААТD. Код преостала 33 болесника није доказано присуство ААТD (MM генотип). Алелне фреквенције за испитивану групу болесника су износиле 20% за Z, 2% за S и 76% за M алел, а ретки алели су заједно имали фреквенцију од 2%. Разлике у нивоу Нсу између болесника са различитим

генотиповима, приказане у Табели X, нису биле статистички значајне (P=0,115).

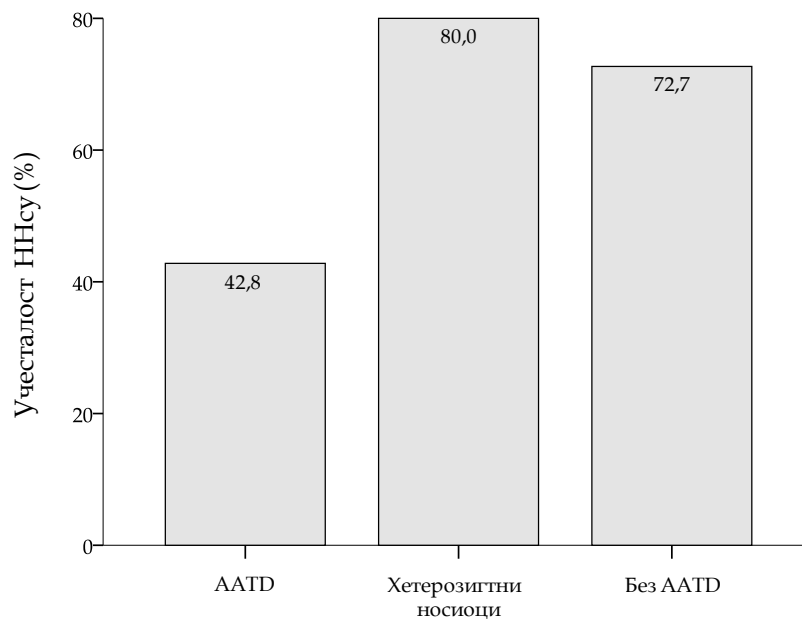
Табела X *SERPINA1* генотип и концентрација Нсу код болесника.

Генотип	Број болесника	Нсу (Ме(мин-макс), $\mu\text{mol/L}$ )
ZZ	5	10,11 (7,83–34,64)
ZРетки алели	2	31,87 (23,52–40,22)
MZ	8	13,63 (9,30–18,73)
MS	2	15,45 (13,05–17,82)
MM	33	12,74 (5,92–27,70)

Концентрације Нсу и учесталост ННсу код болесника са различитим ААТД статусом су приказане на Сликама 25 и 26.



Слика 25. ААТД статус и ниво Нсу код болесника - Ме (IQR) и Box-and-Whisker график.



Слика 26. AATD статус и учесталост ННСу код болесника.

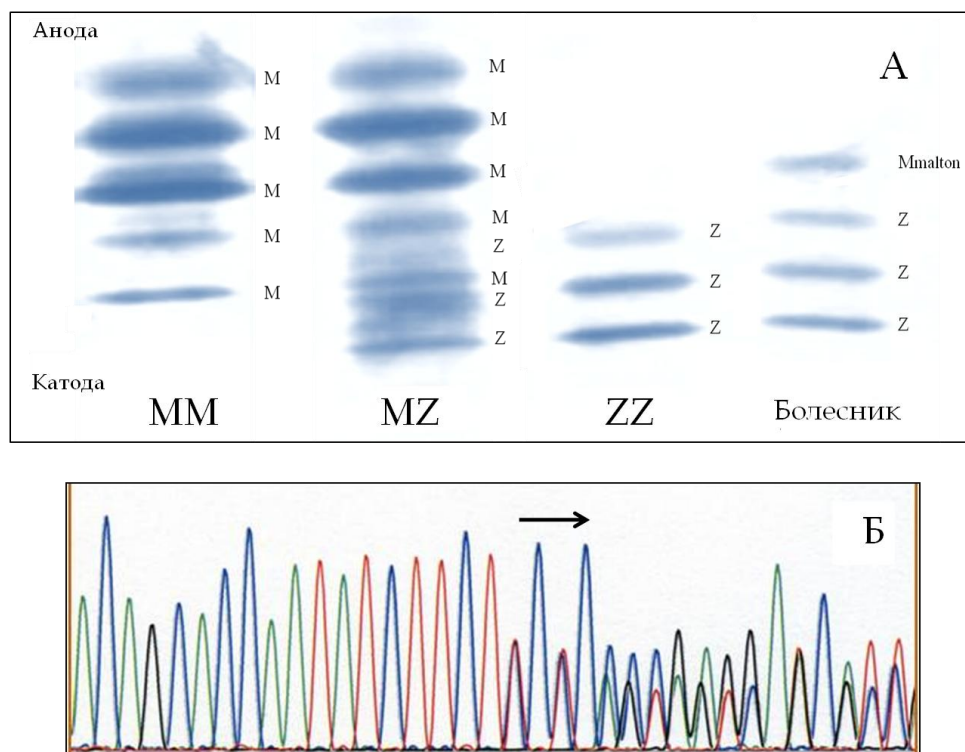
Поређењем групе са AATD, хетерозиготних носилаца и болесника без овог генетског поремећаја, нису показане значајне разлике у нивоу Нсу ( $P=0,785$ ) и учесталости ННСу (0,249). OR од 0,258 (0,050-1,337) је указао да AATD није значајан фактор ризика за појаву ННСу ( $P=0,107$ ).

Испитивање AATD код болесника укључених у студију омогућило је и да се процени ефикасност интегративног лабораторијског алгорита за детекцију AATD. Концентрације AAT измерене код болесника са различитим SERPINA1 генотиповима су приказане у Табели XI.

Табела XI SERPINA1 генотип и концентрација AAT код болесника.

Генотип	Број болесника	AAT (Me(мин-макс), g/L )
ZZ	5	0,21 (0,20-0,26)
ZРетки алели	2	0,16 (0,11-0,20)
MZ	8	0,77 (0,65-2,27)
MS	2	1,72 (1,14-2,30)
MM	33	1,36 (0,92-2,35)

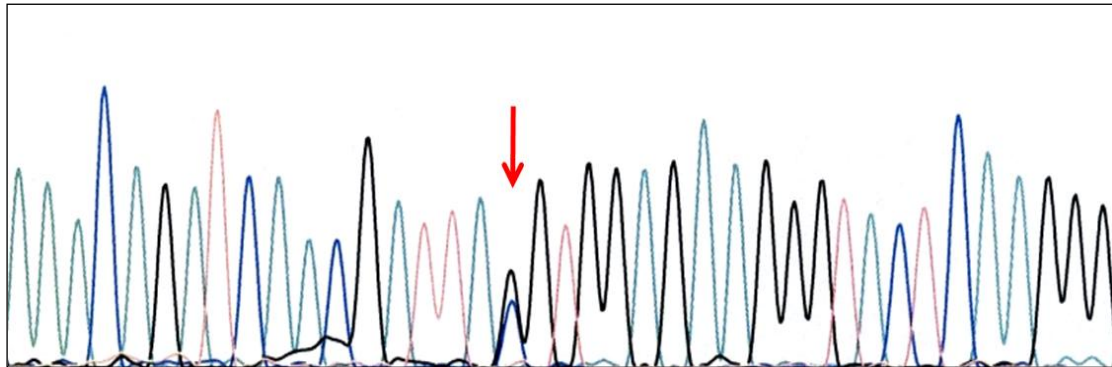
Концентрација ААТ код болесника са ААТД (0,20 (0,11–0,26) g/L) је била значајно нижа у поређењу са хетерозиготним носиоцима (0,96 (0,65–2,30) g/L;  $P < 0,001$ ) и болесницима без ААТД (1,31 (0,92–2,35) g/L;  $P < 0,001$ ), при чему није показана значајна разлика између последње две групе болесника ( $P = 0,125$ ). Значајна је и чињеница да је код половине хетерозиготних носилаца (3 са MZ и 2 са MS генотипом) концентрација ААТ била у опсегу референтних вредности. Резултати добијени у "првој линији" тестирања су били довољни за процену присуства ААТД код 48 болесника. Неслагање између концентрације ААТ и резултата генотипизације се појавило код два болесника. У првом случају је налаз MZ генотипа пратила концентрација ААТ од 0,20 g/L. Након ИЕФ је уочена додатна трака која је побудила сумњу на присуство  $M_{\text{malton}}$  алела (Слика 27А). Секвенцирањем је потврђен генотип  $ZM_{\text{malton}}$  (Слика 27Б).



Слика 27. А - Фенотипизација ААТ код болесника са  $ZM_{\text{malton}}$  генотипом.

В - Секвенца дела егзона 2 у гену *SERPINA1*. Означена је хетерозиготна "in-frame" делеција TTC кодона за Phe75 или Phe76.

У другом случају је код болесника са MZ генотипом измерена концентрација ААТ од 0,11 g/L. Након ИЕФ није уочено присуство додатних трака у гелу, што је отворило могућност присуства неког од нултих алела. Секвенцирањем је потврђено присуство нултог алела Q0amersfoort (Слика 28).



Слика 28. Секвенца дела егзона 2 у гену SERPINA1. Означена је хетерозиготна мутација Tyr184TAG – stop184TAG.

На основу добијених резултата било је могуће проценити и ефикасност детекције ААТД у испитиваној групи болесника када би се користио "screening" приступ заснован на концентрацији ААТ. У том случају 5 хетерозиготних носилаца би остало недетектовано, док генотип код болесника са ААТД који су двоструки хетерозиготи за Z и ретке алеле не би могао бити поуздано одређен. Без обзира на ове податке, интегративни алгоритам није показао бољу ефикасност у детекцији ААТД ( $P=0,500$ ) односно хетерозиготних носилаца ( $P=0,063$ ).

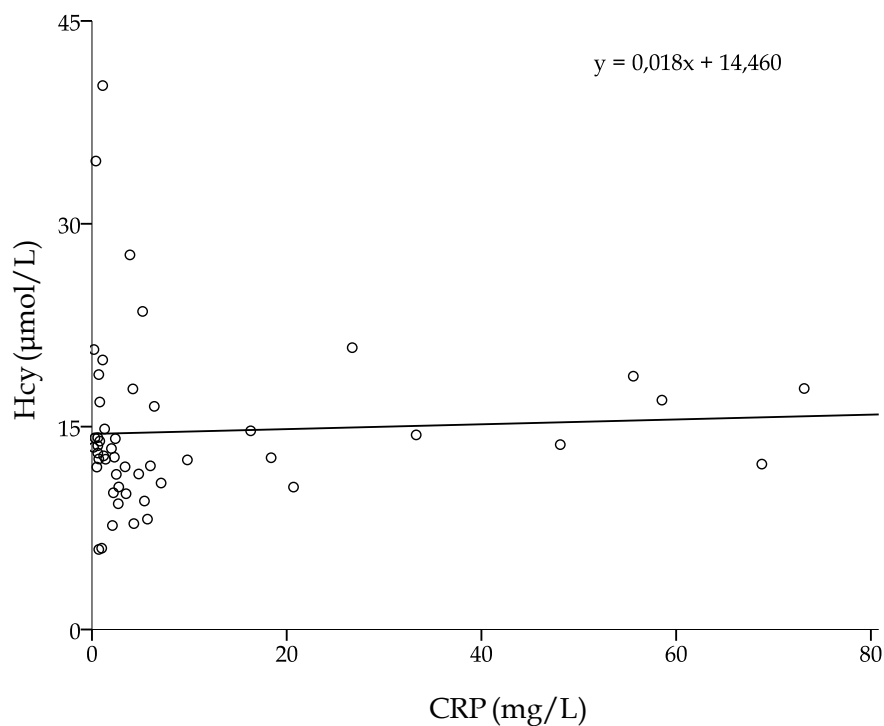
#### 4.7. Повезаност са концентрацијом CRP

Дистрибуција вредности CRP није била Гаусовог типа ни код болесника ( $P < 0,001$ ) ни у контролној групи ( $P = 0,030$ ). Болесници су имали значајно веће концентрације (Табела XII).

Табела XII Концентрација CRP код болесника и у контролној групи

	CRP (Me (IQR), mg/L )	P
Болесници	2,60 (0,80–6,57)	0,032
Контролна група	1,70 (0,86–2,56)	

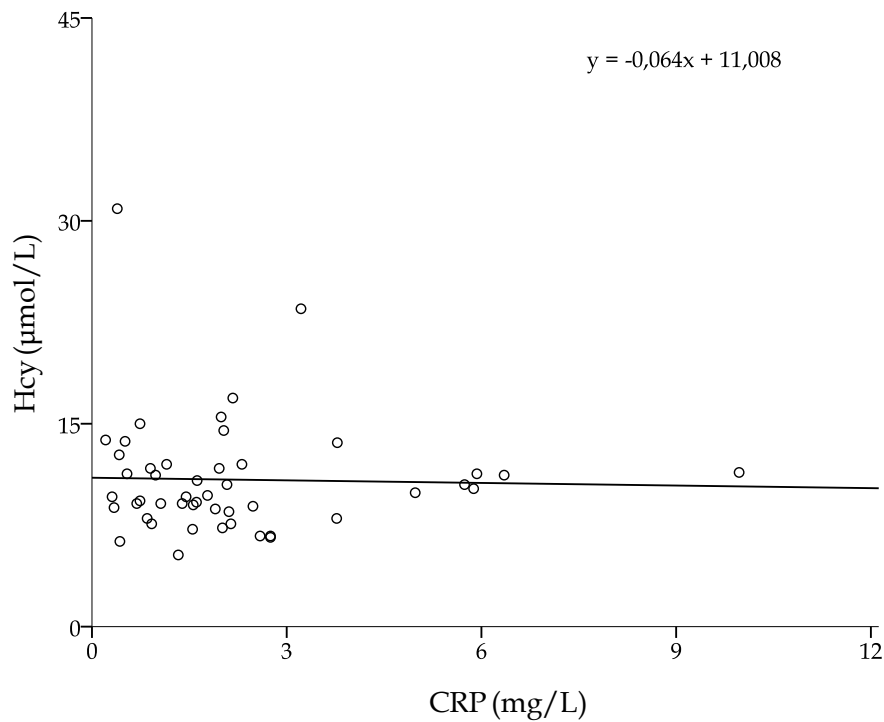
Повезаност концентрација CRP и Hcy код болесника и у контролној групи су графички приказане на Сликама 29 и 30. Вредност  $\rho_s$  од  $-0,046$  у групи оболелих, указивала је да није било статистички значајне корелације ( $P = 0,749$ ).



Слика 29. Корелација концентрација CRP и Hcy код испитиваних болесника.



За контролну групу вредност  $\rho_s$  је износила  $-0,034$  што такође није указивало да је корелација значајна ( $P=0,818$ ).



Слика 30. Корелација концентрација CRP и Hcy у контролној групи.

Додатно, није показано да се вредности CRP статистички значајно разликују у зависности од тога да ли је код болесника присутна Hcy (Табела XIII).

Табела XIII Концентрација CRP и појава Hcy код испитиваних болесника

	CRP (Me (IQR), mg/L)	P
Присутна Hcy	2,30 (0,70–16,30)	0,743
Без Hcy	3,40 (2,10–5,39)	

OR од 1,333 (0,375–4,742) је указао да повишена вредност CRP није значајан фактор ризика за појаву Hcy код оболелих од ХОБП ( $P=0,657$ ).

#### 4.8. Заједнички утицај испитиваних фактора

Процена заједничког утицаја испитиваних фактора започета је испитивањем да ли је значај присуства ХОБП као фактора ризика за развој ННсу различит код мушкараца и жена, односно да ли на њега има утицај старост особе, МТНFR 677 Т алел и повишене вредности CRP. Примењена је метода логистичке регресионе анализе, чији су резултати приказани у Табели XIV.

Табела XIV Утицај додатних чинилаца на значај ХОБП као фактора ризика за настанак ННсу.

	OR	95% CI	P
ХОБП	3,913	1,573–9,732	0,003
Пол	1,563	0,647–3,776	0,321
Старост изнад 50 година	1,307	0,509–3,355	0,578
МТНFR 677 TT	4,080	0,906–18,376	0,067
МТНFR 677 Т алел	1,325	0,515–3,409	0,559
Повишен CRP	1,233	0,439–3,466	0,691

Поређењем са вредношћу OR када се ХОБП посматра изоловано (3,889, P=0,002) закључено је да наведени додатни чиниоци не утичу у значајној мери на значај који има присуство ХОБП као фактор ризика за настанак ННсу. Такође је уочено да поменути чиниоци не представљају значајне факторе ризика за настанак ННсу.

Значај испитиваних фактора као предиктора концентрације Нсу код оболелих од ХОБП је процењен мултиплом регресионом анализом. У Табели XV су приказане добијене вредности нестандардизованих (B) и стандардизованих коефицијената ( $\beta$ ) односно њихова значајност.

Табела XV Предиктори концентрације Нсу код оболелих од ХОБП.

	B	$\beta$	P
Пол	1,063	0,084	0,568
Старост изнад 50 година	-0,988	-0,078	0,595
MTHFR 677 TT	9,291	0,479	0,004
MTHFR 677 T алел	-3,583	-0,218	0,220
MTHFR 1298 CC	-0,485	-0,037	0,871
MTHFR 1298 C алел	1,788	0,141	0,606
MTHFR 677 T + 1298 C алел	1,475	0,090	0,724
Фолат	0,060	0,020	0,886
Витамин B <sub>12</sub>	-0,007	-0,302	0,025
Повишен CRP	0,064	0,187	0,213
AATD	9,558	0,526	0,001

Мултипла регресиона анализа је показала да су наведени чиниоци одговорни за 64,7% варијације у концентрацији Нсу у испитиваној групи болесника са ХОБП. Као статистички значајни предиктори идентификовани су MTHFR 677 TT генотип, концентрација фолата и присуство AATD. Присуство MTHFR 677 TT генотип у просеку доводи до пораста концентрације Нсу за 9,037  $\mu\text{mol/L}$ . Пораст нивоа витамина B<sub>12</sub> за 1 ng/L изазива просечно снижење концентрације Нсу за 0,007  $\mu\text{mol/L}$ , док се присуство AATD повезује са порастом концентрације Нсу који износи у просеку 9,558  $\mu\text{mol/L}$ .

Логистичка регресиона анализа је примењена и за процену ризика за настанак HНсу у случају заједничког присуства испитиваних фактора ризика (Табела XVI).

Табела XVI Фактори ризика за настанак ННсу у испитиваној групи болесника.

	OR	95% CI	P
Пол	0,998	0,181–5,506	0,998
Старост изнад 50 година	1,267	0,190–8,456	0,807
MTHFR 677 TT	/*	/*	/*
MTHFR 677 T алел	1,315	0,103–16,745	0,833
MTHFR 1298 CC	5,861	0,421–81,654	0,188
MTHFR 1298 C алел	0,086	0,002–3,647	0,199
MTHFR 677 T + 1298 C алел	3,086	0,061–155,994	0,573
Фолат < 6,6 µg/L	1,146	0,113–11,593	0,908
Витамин B12 < 473 ng/L	14,440	1,331–156,604	0,028
Повишен CRP	0,612	0,089–4,193	0,617
AATD	0,699	0,068–7,164	0,763

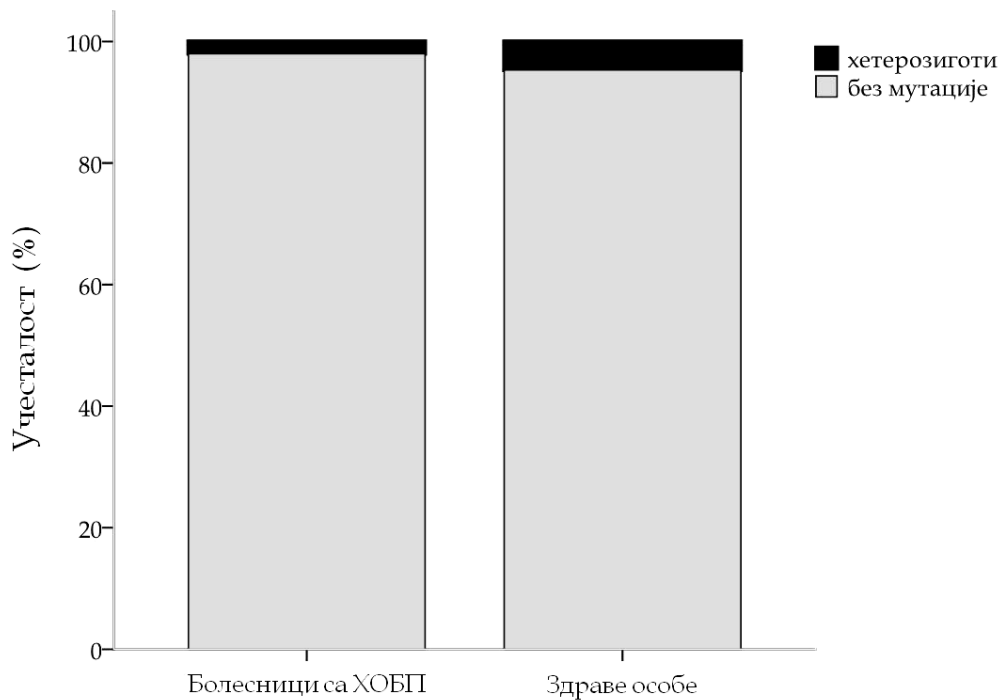
\*вредност није могла бити израчуната јер су сви болесници MTHFR 677 TT са генотипом имали ННсу.

Статистичка значајност за OR вредност је показана једино за дефицијенцију витамина B12, дефинисану као концентрација мању од 473 ng/L. Уколико је присутна ризик за настанак ННсу се просечно повећава око 14 пута.

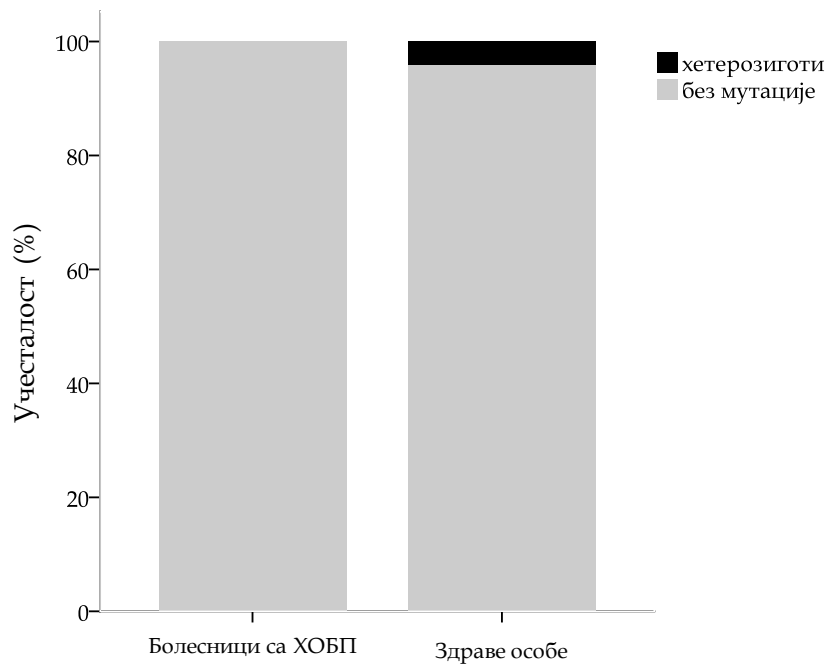
#### 4.9. Учесталост мутација FV Leiden и FII G20210A

Међу 50 испитиваних болесника хетерозиготно присуство мутације FV Leiden је доказано код једне особе, док присуство мутације FII G20210A није детектовано. Резултати су упоређени са претходно објављеним подацима добијеним у испитивању у којем је међу 120 здравих особа са

територије Србије идентификовано 7 хетерозиготних носилаца мутације FV Leiden и 5 хетерозиготних носилаца мутације FII G20210A (141), што је графички приказано на Сликама 31 и 32. На основу резултата Fisher's Exact Test-а закључено је да између ове две групе не постоји статистички значајна разлика у учесталости мутација FV Leiden ( $P=0,439$ ) и FII G20210A ( $P=0,171$ ).



Слика 31. Учесталост мутације FV Leiden код испитиване групе болесника и код здравих добровољаца.



Слика 32. Учесталост мутације FII G20210A код испитиване групе болесника и код здравих добровољаца.

## 5. Дискусија

### 5. 1. Концентрација Нсу и учесталост ННсу

Резултати студије указују да у је у групи испитиваних болесника са ХОБП ниво Нсу за  $3,42 \mu\text{mol/L}$  односно приближно 25% виши у односу на здраве особе исте старости (Табела IV). Наћен је благи облик ННсу код 64% испитиваних болесника, док су концентрације које одговарају умереној ННсу измерене код 6% болесника укључених у студију (Слика 4). У претходним студијама код болесника са ХОБП аналогне разлике су биле изражене у различитом степену. Код јапанских болесника просечна вредност концентрације Нсу је била већа за приближно 31% односно 13% у зависности да ли је поређена са нивоом код непушача или код пушача са очуваном плућном функцијом (128). Seemungal и сарадници (129) су код здравих уочили ниво Нсу нижи за око 21% него код оболелих од ХОБП. За групу италијанских болесника је наћени ниво Нсу био за приближно 17% виши него у контролној групи разлика (130). На основу података о расподели концентрација Нсу може се закључити је да је код болесника у све три студије постојала блага ННсу (128-30).

Литературни подаци говоре у прилог томе да је разлику у нивоу Нсу, уочену између групе болесника и контролне групе у овој студији, оправдано сматрати значајном и са клиничког аспекта. Процењено је да пораст концентрације Нсу од  $2,5 \mu\text{mol/L}$  последично увећава укупни кардиоваскуларни ризик за 10% (145). Резултати мета-анализа су показали да присуство благе ННсу 2–3 пута увећава ризик за настанак венског тромбоемболизма, при чему је повећање ризика посебно изражено код болесника млађих од 60 година (146). У овом контексту треба имати у виду да процењени пораст ризика значајним делом зависи и од дизајна саме студије. Проспективне студије повезују пораст концентрације Нсу од  $5,0 \mu\text{mol/L}$  са повећањем ризика за 27%, док је у ретроспективним иста

разлика у концентрацији доводила до пораста ризика од 60% (147). За разлику од венских, повезаност артеријских тромбоза са благом ННсу није још увек процењена са задовољавајућом поузданошћу, премда постоје литературни подаци који је потврђују (146).

Пораст нивоа Нсу код оболелих од ХОБП у односу на здраве особе, показан у овој студији, је компарабилан са повећањем од 21%, уоченим у истраживању која је укључило болеснике са плућном емболијом са територије Републике Србије (148). Такође, скоро идентичан пораст нивоа Нсу као у овој студији је добијен испитивањем у групи формираној од болесника који су имали артеријске или венске тромбозе (149). Поређење са резултатима студије о Нсу као фактору ризика за настанак коронарне болести у српској популацији показало је нешто израженији пораст код старијих болесника са акутним инфарктом миокарда (приближно 31%) (2). Код болесника са ангином пекторис, укључених у исту студију, забележен је пораст од око 13% (2), што је дуго мање у односу на болеснике са ХОБП. С обзиром да су болесници у студији били млађи од 45 година када им је дијагностикована ХОБП, значајан може бити и податак да је пораст концентрације Нсу био скоро три пута већи од повећања присутног у групи болесника код којих је до развоја инфаркта миокарда дошло пре 45 године (150).

Код 75% болесника са ХОБП укључених у студију била је присутна ННсу, што представља три пута већу учесталост него у контролној групи (Слика 7). С обзиром да резултати претходних студија о повезаности ННсу и ХОБП не укључују учесталост ННсу, наведени податак представља прву процену о појави тог метаболичког поремећаја код оболелих особа. Такође инциденца ННсу у овој студији је значајно већа од учесталости забележене у претходним студијама код болесника са територије Републике Србије. У групи са плућном емболијом ННсу се појавила са инциденцом од 51,5% (148), код особа са историјом артеријске или венске



тромбозе 55% (149), док је код болесника са инфарктом миокарда млађих од 45 година учесталост износила 34,6% (150).

Применом логистичке регресионе анализе показана је значајна повезаност ХОБП и поремећаја у метаболизму Нсу, у смислу да је код оболелих 3,9 пута повећан ризик од појаве ННсу. Код италијанских болесника ХОБП и ННсу су били повезани на сличан начин, са том разликом што је ризик био повећан 1,3 пута, што је такође представљало значајно повећање, али мање изражено него у овој студији (130). Seemungal и сарадници (129) су повезаност испитивали мултиплом регресионом анализом и утврдили да је присуство ХОБП значајан позитиван предиктор нивоа Нсу.

Поређењем вредности Нсу код хоспитализованих и амбулантно лечених болесника, као и између оболелих са радиографски доказаним емфиземом и групе без таквог налаза нису откривене значајне разлике. Овакви резултати могу на индиректан начин упутити на закључак да се степен тежине болести не рефлектује кроз ниво Нсу. Међутим, узимајући у обзир чињеницу да тежина болести није процењена према GOLD критеријума, наведени закључак је поузданије посматрати као хипотезу коју би било значајно испитати у даљим студијама. У прилог оваквом становишту говоре и контрадикторни резултати претходних студија. Код болесника јапанског порекла појава ННсу је била карактеристична за стадијуме GOLD 1 и 2, док су болесници чија је тежина болести описивана као GOLD 3 и 4 имали ниже вредности Нсу (128). Насупрот њима Seemungal и сарадници (129) су показали да су тежи облици болести повезани са вишим концентрацијама Нсу. У студији на италијанским болесницима није доказано да постоји статистички значајна повезаност концентрације Нсу и степена бронхоопструкције (130). Сходно томе, изнета су два становишта о узроку уочених неслагања. Прво је да она могу бити последица разлике у етничкој структури болесника. Такође, као други узрок је наведена могућност да евентуалну повезаност није било

могуће поуздано проценити услед релативно малог броја испитаника које су укључиле поменуте студије (130).

Претпоставља се да иницијатор појаве ННсу у ХОБП представљају репарациони механизми који су веома активни у плућном ткиву оболелих. Њих карактерише интензивна метилација ДНК, РНК и различитих протеина, за шта је неопходна велика количина донора метил група тј. S-аденозил-Met. Последично долази до генерисања велике количине S-аденозил-Нсу односно Нсу, у самом ткиву и у крви (135). Повећање нивоа Нсу активира више механизма који продубљују оштећење плућа. Приликом објашњења повезаности ХОБП и ННсу аутори наглашавају да су штетне компоненте дуванског дима "окидач" који води појави ННсу. У контексту таквих разматрања важно је напоменути да болесници у овој студији нису били пушачи у моменту укључења. Нађени повишен ниво Нсу и учесталост ННсу могу указивати на чињеницу да је овај метаболички поремећај присутан код оболелих од ХОБП без обзира да ли је изложеност дуванском диму била фактор ризика за настанак ХОБП.

Међу поменутиим механизмима оксидативни стрес је најдуже проучаван. Сматра се да ННсу иницијално ремети равнотежу синтезе различитих компоненти система антиоксидантне заштите (33, 34). Настала неравнотежа у редокс систему ћелије доводи до снижења расположиве количине фолата чиме се генеришу нове количине Нсу и појачава оксидативни стрес (32). Повећање концентрације Нсу такође представља сигнал за активацију леукоцита, у првом реду неутрофила и моноцита, те и на тај начин доприноси ендотелној дисфункцији (33).

Поред ових механизма, који говоре у прилог тога да је појава ННсу последица присуства ХОБП, извесни експериментални подаци указују на могућност да је ННсу укључена у патогенезу ХОБП. Стварање великих количина Нсу-тиолактона и последично стварање N-хомоцистеинил деривата са различитим протеинима укљученим у хуморални и ћелијски имуни одговор може бити повезана са аутоимунским механизмима

настанка ХОБП (7). У овом контексту треба посматрати и способност ННсу да активира апоптозске путеве.

## 5. 2. Утицај пола

Ниво Нсу се није разликовао између мушких и женских болесника у овом истраживању (Слика 8). За разлику од њих, у контролној групи је показано да је концентрација Нсу виша код мушкараца него код жена (Слика 8), што је у складу са раније објављеним литературним подацима (9). Такође није било значајне разлике у инциденци ННсу између особа мушког и женског пола, без обзира да ли су оболеле од ХОБП или су здраве (Слика 9). Логистичка регресиона анализа је показала да пол не представља значајан фактор ризика за настанак ННсу код особа са ХОБП.

Наведени резултати су сагласни са налазима студије у групи италијанских болесника, у којој такође није показана значајна разлика у нивоу Нсу између мушкараца и жена (130). Насупрот овим запажањима, Seemungal и сарадници (129) су и код испитиваних болесника показали да је ниво Нсу виши код мушкараца. Разлике у концентрацији Нсу између мушкараца и жена нису процењиване у студији на јапанским болесницима (128).

У студији је уочено да мушки и женски болесници имају значајно више концентрације Нсу односно инциденцу ННсу у поређењу са здравим особама истог пола. Резултате оваквих поређења у основи треба тумачити као додатни доказ да је ризик од појаве ННсу исти код оба пола. Међутим, додатно се може запазити да су разлике, како у нивоу Нсу тако и у учесталости ННсу, нису у истој мери изражене код мушкараца и жена. Жене оболеле од ХОБП су имале ниво Нсу већи за  $4,3 \mu\text{mol/L}$ , што је представљало разлику која је била 3,3 пута већу од оне уочене код мушкараца. Аналогно поређење разлике у инциденци ННсу указује да је она 1,5 пута већа у женском делу популације укључене у студију. Наведене разлике не само да сведоче у прилог становишта да је ризик за настанак

васкуларне болести повезане са ННсу једнак код оба пола, чак и пре менопаузе (9–11), већ уводе и хипотезу да би ризик могао бити повишен код жена, коју је неопходно проверити у већим проспективним студијама.

### 5. 3. Утицај старости

Старост и ниво Нсу нису били у значајној корелацији ни код болесника ни у контролној групи (Слике 10 и 11). Додатно, болесници су били подељени у две групе (старији и млађи од 50 година) између којих није доказана значајна разлика у нивоу Нсу. Додатно, логистичком регресијом је показано да старост не представља значајан фактор ризика за настанак ННсу код оболелих.

Добијени резултати нису били у сагласности са претходним литературним наводима који су и старост, поред пола, означили као најзначајнију биолошку детерминанту концентрације Нсу (9). Аналогно подацима о утицају пола на ниво Нсу, претходне студије код болесника са ХОБП су дале и различите резултате по питању корелације са годинама испитаника. Резултати Seemungal и сарадника (129), слично резултатима у овој студији, нису указали да постоји значајна корелација. Са друге стране, у студији код италијанских болесника је доказан значајан степен повезаности између старости болесника и концентрације Нсу (130).

При интерпретацији различитих закључака о повезаности старости и концентрације Нсу треба узети у обзир и чињеницу да је број испитаника у овој, као и у остале две студије, релативно мали, као и да постоји разлика у старости испитаних болесника. Болесници укључени у ову студију су били више од две деценије млађи од оболелих које су испитивали Seemungal и сарадници (129), односно италијански аутори (130), али је истовремено и опсег старости био знатно шири. На основу оваквих разматрања могуће је одсуство корелације између нивоа Нсу и старости објаснити чињеницом да старост већине испитаника није била изнад 65 година, што представља границу када, према литературним

подацима, корелација нивоа Нсу и старости постаје израженија (9). Ово објашњење такође указује на потребу за већим проспективним студијама у којима би старији испитаници били заступљенији.

#### 5. 4. Утицај полиморфизама МТНFR С677Т и А1298С

Полиморфизам МТНFR С677Т је био нађен код укупно 64% испитиваних болесника, код 12% у хомозиготном односно код 52% у хетерозиготном облику (Слика 12), што је одговарало фреквенцији Т алела од 37,8%. Добијене вредности представљају прве податке о учесталости овог полиморфизма код оболелих од ХОБП. Поређењем са фреквенцијама добијеним за контролну групу може се закључити да Т алела није заступљенији код оболелих у односу на здраве. У прилог оваквом закључку говори и чињеница да се процењена фреквенца Т алел на глобалном нивоу креће у опсегу 7–40% (17). Такође и у истраживању на групи здравих особа пореклом са територије Србије добијена је фреквенција Т алела од 31,2% односно збирна учесталост носилаца од 50,4% (39,2% хетерозиготних и 11,2% хомозиготних) (141).

Код хомозиготних носилаца Т алела концентрација Нсу је била већа за 5,6  $\mu\text{mol/L}$  у односу на ниво измерен код хомозиготних носилаца С алела (Слика 13), што је представљало значајну разлику како са статистичког, тако и са биолошко-клиничког аспекта, обзиром да је била душло већа од оне која се наводи у литератури (9, 16, 151). Потребно је нагласити и да је разлика у веома сличном степену била изражена и када је концентрација Нсу упоређена између болесника са ТТ и СТ генотипом. Смањење активности МТНFR услед присуства овог полиморфизма, које код хомозиготних носилаца може износити и до 70% (9, 16), може у великој мери објаснити постојање наведених разлика. Међутим, при тумачењу чињенице да су разлике израженије у односу на оне које се наводе у литератури, требало би размотрити и могућност да су за њихов настанак одговорни механизми специфични за ХОБП, првенствено изражена

хиперметилација приликом репарације оштећеног плућног парехнима. На заснованост овакве хипотезе упућују и резултати ранијих студија код болесника са територије републике Србије, у којима није доказано да присуство полиморфизма МТНFR С677Т утиче на ниво Нсу код болесника са плућном емболијом или код особа код којих је дошло до развоја инфаркта миокарда пре 45. године живота (148, 150).

Премда са статистичког аспекта није показано да су разлике у учесталости ННсу код болесника са различитим МТНFR С677Т генотиповима значајне, уочава се јасан тренд пораста-од 55,5% код хомозигота за "wild type" алел, преко 73,1% код хетерозиготних носилаца полиморфизма па до 100% код хомозигота за Т алел (Слика 14). Додатно, чињеница да су уочене инциденце прилично високе, као и да логистичка регресија није показала да је присуство МТНFR 677 Т алела фактор ризика за настанак ННсу, такође може указивати да до појаве ННсу долази кроз синергистичку интеракцију полиморфизма МТНFR С677Т и патофизиолошких механизма у ХОБП.

Резултати добијени у овој студији такође су и први подаци о учесталости полиморфизма МТНFR А1298С код болесника са ХОБП. Расподела генотипова (58,0% АА, 24,0% АС и 18,0% СС) (Слика 15) је одступала од Hardy Weinberg-ове равнотеже и то у смислу да је СС генотип имао душло већу учесталост од очекиване. Овакво запажање може бити потврђено и поређењем са подацима доступним у литератури (17, 151). Међутим, биомедицински значај уоченог одступања не може бити поуздано процењен на основу резултата ове студије. Разлог за то је релативно мали број испитаника, али и чињеница да није показано да присуство полиморфизма утиче на ниво Нсу и појаву ННсу.

Наиме, скоро идентичне концентрације Нсу су нађене код болесника са АА и АС генотипом. Вредности код хомозиготних носилаца полиморфизма су биле нешто веће, при чему разлика није била значајна (Слика 16). Такође и инциденца ННсу у групама оболелих са различитим

MTHFR A1298C генотипом се кретала у веома уском опсегу (66,7–72,7) (Слика 17). Ови резултати су, за разлику од података о дистрибуцији генотипова, били у складу се литературним наводима (16, 17, 151).

Комбиновано присуство оба полиморфизма је откривено код 9 болесника. Међу њима је било 6 комбинованих хетерозигота, два са хетерозиготним присуством MTHFR C677T заједно са генотипом MTHFR 1298 CC, а један болесник је био хомозиготни носилац MTHFR C677T и хетерозиготни носилац MTHFR A1298C. Међутим литературни подаци да је ниво Нсу повећан код особа код којих су присутна оба полиморфизма (16, 17, 151) нису потврђени резултатима студије (Табела V).

## 5. 5. Утицај концентрације фолата и витамина B<sub>12</sub>

Просечне вредности концентрације фолата (4,13 µg/L) односно витамина B<sub>12</sub> (463,6 ng/L), измерене код болесника укључених у студију, су се разликовале у односу на нивое који су добијени у претходним студијама код оболелих од ХОБП. Тако су у истраживању на шведским болесницима добијене више вредности фолата (7,0 µg/L) и витамина B<sub>12</sub> (540,0 ng/L) (132), док су у италијанској групи вредности биле ниже како за фолат (2,5 µg/L), тако и за витамин B<sub>12</sub> (324,5 ng/L) (130). У интерпретацији поменутих разлика треба узети у обзир чињеницу да су болесници у шведској студији били старији, као и да није наведен прецизан податак о методи мерења нивоа витамина (132), док је италијанска група формирана од болесника који су најмање 6 месеци били у ремисији (130). Резултати добијени у овој студији такође указују да пол и старост показују другачији утицај на ниво фолата и витамина B<sub>12</sub> код оболелих од ХОБП у односу на здраве особе. Тако је у здравој популацији показано да је код жена ниво фолата већи у односу на мушкарце (21, 152), као и да постоји позитивна корелација између старости и концентрације фолата (21, 152) односно витамина B<sub>12</sub> (21). Код болесника мушког и женског пола, укључених у ову

студију, нису уочене разлике у нивоу витамина, а корелација са годинама живота је показана само код фолата.

Резултати истраживања указују на различиту повезаност нивоа поменутих витамина и концентрације Нсу код болесника са ХОБП. Прецизније, корелација нивоа фолата и Нсу није била значајна (Слика 18), док је код витамина Б<sub>12</sub> уочена значајна негативна повезаност (Слика 19). Оваква запажања су потврђена и чињеницом да између болесника код којих је дошло до појаве ННсу и оних без таквог налаза, разликују концентрације витамина Б<sub>12</sub>, док су концентрације фолата компарабилне (Слике 20 и 21). Овакви резултати се у извесној мери разликују од оних који су добијени у претходним студијама. Seemungal и сарадници (129) нису нашли повезаност дефицијенције фолата и витамина Б<sub>12</sub> са концентрацијом Нсу. Међутим, применљивост њиховог закључка је ограничена чињеницом да нивои витамина нису одређивани, већ су били процењени поређењем података из "food frequency" упитника са препорученим дневним уносом витамина (129). У групи италијанских болесника добијена је значајна корелација нивоа Нсу и концентрације фолата, док је повезаност са концентрацијом витамина Б<sub>12</sub> описана као тренд без статистичког значаја (130).

Концентрације фолата се нису разликовале између болесника са различитим МТНFR С677Т генотиповима (Слика 22), што није било у сагласности са претходним подацима из литературе (16, 151). Када је у питању полиморфизам МТНFR А1298С, резултати студије (Слика 23) су потврдили претходне податке да нема утицаја на концентрацију фолата (16, 151). Наведена запажања би се могла интерпретирати као додатна потврда да утицај интензивне метилације током репарације оштећеног плућног паренхима на пораст Нсу може надвладати утицаје осталих генетских и стечених фактора утицаја.

За дефинисање дефицијенција витамина, приликом испитивања њиховог значаја као фактора ризика за појаву ННсу коришћене су



литературне cut-off вредности - за фолат 4,0, 6,6 и 8,0  $\mu\text{g/L}$  односно 203 и 473  $\text{ng/L}$  за витамин  $\text{B}_{12}$  (18, 20–22, 152, 153). Без обзира што су добијене значајне разлике у учесталости недостатка одговарајућих витамина, није показано да оне представљају значајан фактор ризика за појаву ННсу (Табеле VI и VIII). Повезаност недостака витамина и концентрације Нсу је испитана и у супротном смеру, како би се проверило да ли појава ННсу може послужити као биомаркер њихове дефицијенције. У ову сврху, поред cut-off-а 12  $\mu\text{mol/L}$ , ННсу је дефинисана и као концентрација Нсу изнад 10 односно 15  $\mu\text{mol/L}$ . Међутим, резултати ROC анализе су показали да се код испитиваних болесника на основу појаве ННсу не може предвидети недостатак фолата односно витамина  $\text{B}_{12}$ , без обзира које се концентрације користе за дефинисање ННсу, односно дефицијенције витамина (Табеле VII и IX). Премда оваква запажања могу упућивати на закључак да одређивање Нсу нема значаја при процени недостатка фолата односно витамина  $\text{B}_{12}$  код оболелих од ХОБП, потребно их је проверити у већим студијама. Поред веће поузданости резултата, укључивање значајно већег броја испитаника би дало могућност и да се идентификују нове cut-off вредности које би омогућиле да процена међусобног утицаја нивоа витамина и концентрације Нсу буде прецизнија у односу на ону која је добијена коришћењем литературних cut-off вредности. Као додатни фактор утицаја коме би требало посветити пажњу у дизајну будућих студија је и дужина трајања ремисије у моменту када се болесници буду укључивали. Наведени фактор може бити значајан с обзиром да је показано да ниво фолата опада услед оксидативног стреса (32), као и да је интензитет оксидативног стреса повећан када се постигне ремисија болести (154). На основу ових чињеница може се поставити хипотеза да је у моменту настанка ремисије повећање нивоа Нсу одраз хиперметилације услед репарације ткива, а да је на овај начин изазвани оксидативни стрес почиње да "троши" резерве фолата, те да би тек након извесног времена, пораст нивоа Нсу почео да буде индикатор дефицита витамина (155). У

прилог оваквој хипотези би могла говорити и чињеница да је већина болесника у ову студију укључена непосредно по постизању ремисије, а да је су у италијанској студији, која је потврдила инверзну корелацију са нивоом фолата, групу сачињавали болесници код којих је ремисија трајала најмање шест месеци (130).

## 5. 6. Повезаност са ААТД

Посматрано искључиво са статистичког становишта резултати студије нису потврдили повезаност поремећаја метаболизма Нсу и ААТД. Корелација између концентрације ААТ и нивоа Нсу није доказана (Слика 24), ниво Нсу се није значајно разликовао између генотипова SERPINA1 (Табела X), а између болесника са ААТД, хетерозиготних носилаца и оболелих без овог генетског поремећаја нису уочене значајне разлике у концентрацији Нсу, односно инциденти ННсу (Слике 25 и 26). Међутим, и поред оваквих закључака статистичке анализе извесне карактеристике добијених резултата, као и епидемиолошки подаци о ААТД указују да постоји оправдање да се настави са истраживањем повезаности ових поремећаја.

Уочава се релативно велики распон концентрација Нсу измерених код болесника са ААТД, при чему су вредности код хомозиготних носилаца Z алела биле видљиво ниже у односу на оне измерене код болесника где је ААТД узрокован комбинованим хетерозиготним присуством Z и ретких алела SERPINA1 (Табела X). У овом контексту се може тумачити и податак да су од укупно три болесника са умереном ННсу два имала и тежак облик ААТД, узрокован управо оваквом генотипском комбинацијом. Такође се чини важним нагласити и да је највећа концентрација у студији (40,22  $\mu\text{mol/L}$ ) измерена код болеснице у чијем су генотипу били присутни Z и нулти алел Q0amersfoort, а која при томе није била носилац полиморфизама MTHFR C677T и A1298C нити је имала недостатак фолата и витамина Б<sub>12</sub>. И појединачно запажање, попут

овог, говори у прилог томе да болесници, генетски предиспонирани за ХОБП услед присуства нултих алела SERPINA1, у патофизиолошком и клиничком погледу предстаљају специфичну групу (156).

Генерално посматрано релативно ниска стопа детекције болесника погођених са ААТД ограничава ефективност специфичних мера у њиховом лечењу и поузданост процена повезаности овог генетског поремећаја са коморбидитетима ХОБП. Најчешће примењиван дијагностички присуп је заснован на screening-у, одређивањем концентрације ААТ и фено- односно генотипизацијом у случају ниских концентрација (101, 102). С обзиром да стечени фактори, у првом реду инфламација, значајно утичу на концентрацију ААТ и самим тим на поузданост резултата screening-а, препоручена је примена интегративног лабораторијског алгоритма, заснованог на комбинацији биохемијских и молекуларно-биолошких метода (103). Степен детекције ААТД код болесника укључених у студију применом оваквог алгоритма је износио 14% и био је значајно виши у поређењу са литературним подацима о проценту особа са ААТД детектованих међу оболелима од ХОБП, како у иностраним (0,5–10,4%) (157), тако и у српској популацији (2,3%) (158). Повећана ефикасност детекције се са једне стране може објаснити употребом интегративног алгоритма, али треба узети у обзир и чињеницу да је студија укључила болеснике код којих је дијагноза ХОБП постављена пре 45. године живота, те је можда и за очекивати да међу њима буде већи проценат особа са ААТД у односу на неселектовану популацију оболелих (102). Овакво објашњење поткрепљују и резултати италијанске студије где је степен детекције ААТД износио око 40% у циљано одабраној групи болесника (ХОБП у млађем животном добу и/или без јасног фактора ризика, бронхиектазије) (159). Истовремена примена квантификације и генотипизације за Z и S алел је "спречила" да 5 хетерозиготних носилаца остану недетектовани (Табела XI). Примена "reflex" тестова, ИЕФ и секвенцирања, омогућила је исправну идентификацију два ретка алела

(Слике 27 и 28). Први од њих,  $M_{\text{malton}}$ , карактеришу концентрације у крви испод 15% од доње границе референтног интервала, а код носилаца је могућ и преурањени развој ХОБП и оштећење јетре (160). Према расположивим литературним подацима болесник са генотипом  $ZM_{\text{malton}}$  је друга особа са таквим генотипом детектована у српској популацији (161). Други ретки алел детектован у студији,  $Q0_{\text{amersfoort}}$ , је откривен 2008. године (162), а болесница са генотипом  $ZQ0_{\text{amersfoort}}$  је прва особа у српској популацији код које је потврђено његово присуство (163). Без обзира на наведене чињенице неопходно је нагласити да статистички није доказано да је дијагностичка ефикасност, постигнута применом интегративног алгоритма, унапређена у односу на ефикасност која би била постигнута screening-ом заснованом на одређивању концентрације ААТ. Највероватнији узрок оваквог резултата статистичке анализе треба потражити у малом броју испитаника (163).

Студија је испитала само један "смер" међусобног утицаја  $\text{HHCu}$  и ААТД. Претпостављени други "смер" би се односио на могућност да оксидативни стрес, проузрокован и појачан присуством  $\text{HHCu}$ , доводи до оксидације бочног остатка метионина у молекулу ААТ, који је неопходан за инхибицију еластазе. Услед тога, молекуле ААТ би могле постати дисфункционалне, без обзира да ли је болесник носилац дефицијентних алела  $\text{SERPINA1}$  (164). У ширем смислу, поменути механизам би могао повезати  $\text{HHCu}$  и протеазно-антипротеазни дизбаланс као узрок ХОБП.

## 5. 7. Повезаност са концентрацијом CRP

Степен хроничне инфламације, рефлектован кроз повишење концентрације CRP-а, се сматра веома важним чиниоцем код оболелих од ХОБП и то како у смислу механизма одговорних за прогресију болести, тако и као фактор ризика за појаву коморбидитета (124, 165, 166). Болесници укључени у студију су имали више вредности CRP у односу на здраве особе (Табела XII), што је у складу са наведеним литературним

подацима. Међутим, корелација између нивоа CRP и Hcy није била значајна ни код оболелих ни у контролној групи (Слике 29 и 30). Такође, ниво Hcy се није разликовао између болесника са HHcy и оних код којих је концентрација Hcy била испод 12  $\mu\text{mol/L}$  (Табела XIII).

Покушаји процене повезаности концентрација CRP и Hcy у претходним студијама су имали различите резултате. У студији Seemungal и сарадника (129) је такође уочен повећан ниво CRP када су болесници упоређени са здравим особама, али је показано и да је он у значајној позитивној корелацији са концентрацијом Hcy. За разлику од ових резултата, код италијанских болесника је нађено да концентрације Hcy и CRP нису у корелацији, иако је и ова група оболелих имала значајно повишене вредности у односу на контролну групу (130).

У интерпретацији уочених разлика у добијеним резултатима потребано је узети у обзир неколико чињеница. Све три студије су укључиле релативно мали број испитаника, који су поред тога били и различите етничке припадности. Додатно, повезаност HHcy и системске инфламације је релативно неконзистентно запажање, чак и у већим и неселективним групама болесника (167). Наведене чињенице упућују на неопходност да се хипотеза о постојању повезаности HHcy и системске инфламације у ХОБП, коју је оправдано посматрати и као индикатор тежине болести, процени на основу резултата обимнијих студија (130).

## 5. 8. Заједнички утицај испитиваних фактора

Почетно питање везано за заједнички утицај испитиваних фактора је било да ли је присуство ХОБП подједнако значајан фактор ризика за настанак HHcy код особа различитог пола и старости, односно да ли је повезан са присуством MTHFR 677 T алела и повишених вредности CRP. Применом логистичке регресионе анализе (Табела XIV) дошло се до одговора да наведени чиниоци, поред тога што не представљају значајне факторе ризика за настанак HHcy, не показују ни значајан модулативни

ефекат на вероватноћу настанка овог метаболичког поремећаја код оболелих од ХОБП. Студија на италијанским болесницима је показала да дужина пушачког стажа утиче на асоцијацију ХОПБ и ННсу, док ефекти системске инфламације, рефлектоване кроз повишене вредности CRP, бубрежне и срчане слабости нису били значајни (130). Посматрани заједно, овакви резултати наговештавају да само присуство ХОБП односно пушење, као њен најчешћи узрок, представљају довољно јак независни чинилац који не само да може довести до појаве ННсу, већ његови ефекти могу надјачати утицај фактора који се традиционално посматрају као предиктори концентрације Нсу.

Додатне смернице у тумачењу оваких запажања су дали резултати мултипле регресионе анализе код болесника укључених у студију (Табела XV). Показано је да је заједничко деловање испитиваних генетских и стечених фактора одговорно за чак 65% варијације у нивоу Нсу. Као значајни предиктори концентрације Нсу идентификовани су присуство MTHFR 677 TT генотипа, дефицит витамина B<sub>12</sub> (дефинисан cut-off-ом од 473 ng/L) и присуство AATD. Чињеница да посматрани засебно, генотип MTHFR 677 TT и недостатак витамина B<sub>12</sub> нису значајни фактори ризика за појаву ННсу, док њихово заједничко присуство у значајној мери одређује ниво Нсу може представљати извесну врсту прелиминарног доказа о значају нутригенетичких интеракција код оболелих од ХОБП (168). Овакав закључак потврђују и резултати логистичке регресије у групи болесника (Табела XVI). Узимајући у обзир све чиниоце испитиване у овој студији недостатак витамина B<sub>12</sub>, дефинисан као серумска концентрација нижа од 473 ng/L, идентификован је као једини значајан фактор ризика за настанак ННсу код оболелих од ХОБП. Овакви резултати се донекле разликују од налаза код Италијана оболелих од ХОБП који указују да су концентрације фолата и витамина B<sub>12</sub>, заједно са нивоом триглицерида, значајни предиктори концентрације Нсу код болесника са ХОБП (130). Међутим, при поређењу је потребно имати у виду да у овој студији није

испитиван утицај триглицерида, док италијанска студија није проучавала значај полиморфизама у гену за MTHFR, као и да су укључени болесници који су били најмање у шестомесечној ремисији.

На улогу AATD као предиктора нивоа Hcy су по први пут указали резултати ове студије. Као једно од могућих објашњења оваквог запажања би могла послужити хипотеза да је присуство овог генетског поремећаја код оболелих изазива израженије оштећење плућног паренхима, а самим тим и већу брзину метилације приликом репарације и последични настанак додатних количина Hcy (113, 135). Међутим, при интерпретацији овог резултата потребно је узети у обзир да је испитивана група укључила релативно мали број болесника код којих је дошло до преурањеног развоја ХОБП, да је AATD у њој имала велику учесталост, као и да су најизраженија повећања уочена код болесника који су носиоци ретких алела SERPINA1.

## 5.9. Учесталост мутација FV Leiden и FII G20210A

У ширем контексту повезаности HHcy и тромбофилије (146), у студији су испитане учесталост мутације FV Leiden односно FII G20210A, које представљају најчешће генетске факторе ризика за настанак венског тромбоемболизма. Премда је показано да је он веома значајан коморбидитет ХОБП (141, 169), с обзиром да се може појавити у 3–29% случајева егзацербација ХОБП (170, 171), количина података о учесталости ових мутација, добијена у популацији оболелих од ХОБП није задовољавајућа.

Међу испитиваним болесницима је идентификован један хетерозиготни носилац мутације FV Leiden, док присуство мутације FII G20210A није доказано ни код једног од болесника укључених у студију (Слике 31 и 32). Поређењем са литературним подацима о учесталости ових мутација у здравој популацији Републике Србије (5,83% за FV Leiden, 4,12% за FII G20210A) (141) закључено је да не постоји значајна разлика. Премда

би овакви прелиминарни резултати могли указивати да ризик од венског тромбоемболизма код оболелих од ХОБП не би требало приписати повећаној инциденци ових мутација, неопходно их је проверити у студијама на већим популација оболелих.

## 5. 10. Ограничења студије и смернице за даља истраживања

Релативно мали број испитаника је најзначајније ограничење истраживања, услед кога је неопходно значајан број добијених резултата означити као "прелиминарне". Међутим, поређења са претходним студијама код болесника са ХОБП се могу сматрати релевантним, с обзиром да су и оне урађене на релативно малом укупном броју испитаника - 47 у јапанској популацији, 54 у студији Seemungal-а и сарадника односно 71 у италијанској студији. У овом контексту су са клиничког аспекта значајне чињенице да су болесници били са једне стране преселектовани, у смислу да је ХОБП дијагностикована у млађем животном добу и да у моменту укључења у студију нису били пушачи, док са друге стране присуство вишемесечне ремисије није био критеријум за њихов одабир, односно није вршена процена стадијума болести према GOLD критеријумима. Међутим чак и као "прелиминарни", резултати студије представљају поуздану основу у развоју хипотеза за даља истраживања значаја поремећаја метаболизма Нсу код болесника са ХОБП.

Као што је већ напоменуто у претходним одељцима дискусије, студије на већем броју неселектованих болесника би повећале поузданост добијених резултата. Поред њих, неопходне су и проспективне студије које би провериле поузданост појаве ННсу као биомаркера за процену "квалитета живота" оболелих, као и ризика од развоја коморбидитета. Такође, чини се значајним испитати и повезаност нивоа Нсу и брзине опадања плућне функције, како код оболелих од ХОБП тако и код "здравих" пушача. (128–130, 172–174).



## 6. Закључци

1. На основу изложених резултата може се закључити да оболели од ХОБП имају у просеку 25% већи ниво Нсу и скоро три пута већу учесталост ННсу у односу на здраве особе, као и да присуство ХОБП приближно 3,9 пута повећава ризик од настанка ННсу.
2. Пол и старост, као најчешће помињане биолошке детерминанте концентрације Нсу, не показују значајан утицај на његов ниво и инциденцу ННсу код испитиваних болесника са ХОБП. Међутим, пораст концентрације Нсу односно инциденце ННсу у односу на здраве особе је знатно израженији код женских болесника.
3. Фреквенција МТНFR 677 Т алела код испитиване групе оболелих од ХОБП је 37,8%, док је МТНFR 1298 С алел нађен код 30,0% оболелих. Концентрација Нсу је повећана код болесника са МТНFR 677 ТТ генотипом, док се МТНFR 1298 С алел не може повезати са разликама у нивоу Нсу. Такође присуство поменутих алела не доводи до значајно повећане учесталости ННсу.
4. Ниво Нсу код болесника са ХОБП укључених у студију није значајно повезан са концентрацијом фолата, али показује значајан степен негативне корелације са нивоом витамина Б<sub>12</sub>. Дефицит поменутих витамина у испитиваној групи оболелих се не може поуздано предвидети на основу пораста концентрације Нсу.
5. Концентрација Нсу и инциденца ННсу нису повезане са присуством ААТD код оболелих. Међутим, уочен је тренд појаве виших концентрација Нсу код болесника који су носиоци ретких алела SERPINA1 гена. Такође, повишене вредности CRP нису у корелацији са нивоом Нсу и учесталошћу ННсу у испитиваној групи болесника са ХОБП.
6. Присуство ХОБП у подједнакој мери повећава ризик од настанка ННсу код особа различитог пола и старости, а такође је уочено да ризик не зависи од присуства МТНFR 677 Т алела односно повишених вредности

CRP. Заједнички утицај испитиваних наследних и стечених фактора се показао одговорним за приближно 65% варијације у нивоу Нсу код болесника укључених у истраживање, при чему су као значајни предиктори идентификовани МТНFR 677 ТТ генотип, дефицијенција витамина Б<sub>12</sub>, дефинисана као серумска концентрација мања од 473 ng/L, и присуство ААТD. Међутим, једино недостатк витамина Б<sub>12</sub> представља фактор ризика за настанак ННсу код испитиваних болесника.

7. Фреквенција мутације FV Leiden у испитиваној групи оболелих је износила 2%, док ни код једног болесника није доказано присуство мутације FII G20210A. Овакви резултати се не разликују значајно од фреквенција са којом се наведене мутације јављају у популацији здравих особа са територије Републике Србије.

## 7. Литература

1. Bing FC. Vincent du Vigneaud (1901-1978): a biographical sketch. *J Nutr* 1982; 112: 1463–73.
2. Мирковић Д. Хомоцистеин као фактор ризика за настанак коронарне болести [дисертација]. Београд, Србија: Универзитет у Београду; 2004.
3. Schalinske KL, Smazal AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr* 2012; 3: 755–62.
4. Williams KT, Schalinske KL. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *Biofactors* 2010; 36: 19–24.
5. Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 17–32.
6. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157: (Suppl 2): 40–44.
7. Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1704–16.
8. Desirable Biological Variation Database specifications. Доступно на <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Приступано 12. маја 2014.
9. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50: 3–32.
10. Cesari M, Rossi GP, Sticchi D, Pessina AC. Is homocysteine important risk factor for coronary heart disease? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 140–7.

11. Verhoef P, Meleady R, Daly LE, Graham IM, Robinson K, Boers GH et al. Homocysteine, vitamin status and risk of vascular disease; effects of gender and menopausal status. *Eur Heart J* 1999; 20: 1234–44.
12. Boushey CJ, Beresford SAA, Omen GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995; 274: 1049–57.
13. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from meta-analysis. *BMJ* 2002; 325: 1202–6.
14. Herrmann W. Significance of hyperhomocysteinemia. *Clin Lab Med* 2006; 52: 367–74.
15. Perła-Kaján J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* 2007; 32: 561–72.
16. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014; 533: 11–20.
17. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: A HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 862–77.
18. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: Suppl 2: 666–72.
19. Jiang B, Ding C, Yao G, Yao C, Zhang Y, Ge J, et al. Intervention effect of folic acid and vitamin B12 on vascular cognitive impairment complicated with hyperhomocysteinemia. *J Med Biochem* 2014; 33: 169–74.
20. Dhonukshe-Rutten RA, de Vries JH, de Bree A, van der Put N, van Staveren WA, de Groot LC. Dietary intake and status of folate and vitamin B12 and their association with homocysteine and cardiovascular disease in European populations. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63: 18–30.

21. Zappacosta B, Persichilli S, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Graziano M, Gervasoni J et al. Folate, vitamin B12 and homocysteine status in an Italian blood donor population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013; 23: 473–80.
22. De Bruyn E, Gulbis B, Cotton F. Serum and red blood cell folate testing for folate deficiency: new features? *Eur J Haematol*. 2014; 92: 354–9.
23. Desouza C, Keebler M, McNamara DB, Fonseca V. Drugs affecting homocysteine metabolism: impact on cardiovascular risk. *Drugs* 2002; 62: 605–16.
24. Ntaiosa G, Savopoulou C, Chatzopoulou S, Mikhailidis D, Hatzitolia A. Iatrogenic hyperhomocysteinemia in patients with metabolic syndrome: A systematic review and metaanalysis. *Atherosclerosis* 2011; 214: 11–9.
25. Belcastro V, Striano P. Antiepileptic drugs, hyperhomocysteinemia and B-vitamins supplementation in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 2012; 102: 1–7.
26. Mazokopakis EE, Starakis IK. Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12 (Cbl) deficiency. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 97: 359–67.
27. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 470–7.
28. Yilmaz N. Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Arch Med Sci* 2012; 8: 138–53.
29. Jakubowski H. Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 2000; 130: Suppl 2: 377–81.
30. Perła-Kaján J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids* 2012; 43:1405–17.
31. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 2649–56.

32. Hoffman M. Hypothesis: hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses* 2011; 77: 1088–93.
33. Veeranki S, Tyagi SC. Defective homocysteine metabolism: potential implications for skeletal muscle malfunction. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 15074–91.
34. Jurkovic S, Osredkar J, Marc J. Molecular impact of glutathione peroxidases in antioxidant processes. *Biochem Med* 2008; 18: 162–74.
35. Malinowska J, Tomczynska M, Olas B. Changes of blood platelet adhesion to collagen and fibrinogen induced by homocysteine and its thiolactone. *Clin Biochem.* 2012; 45: 1225–8.
36. Sauls DL, Wolberg AS, Hoffman M. Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 300–6.
37. Undas A, Brozek J, Jankowski M, Siudak Z, Szczeklik A, Jakubowski H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1397–404.
38. Steed, M.M.; Tyagi, S.C. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1927–43.
39. Stern F, Berner YN, Polyak Z, Komarnitsky M, Sela BA, Hopp M, Dror Y. Homocysteine effect on protein degradation rates. *Clin Biochem* 2004; 37: 1002–9.
40. Gates AT, Lowry M, Fletcher KA, Murugesu A, Rusin O, Robinson JW et al. Capillary electrophoretic screening for the inhibition of homocysteine thiolactone-induced protein oligomerization. *Anal Chem* 2007; 79: 8249–56.
41. Undas A, Perla J, Lacinski M, Trzeciak WH, Kazmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homo cysteinylated proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 2004; 35: 1299–304.

42. Sipkens JA, Hahn N, van den Brand CS, Meischl C, Cillessen SA et al. Homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells coincides with nuclear NOX2 and peri-nuclear NOX4 activity. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67: 341–52.
43. Meischl C, Krijnen PA, Sipkens JA, Cillessen SA, Muñoz IG, Okroj M et al. Ischemia induces nuclear NOX2 expression in cardiomyocytes and subsequently activates apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 913–21.
44. Sipkens JA, Krijnen PA, Meischl C, Cillessen SA, Smulders YM, Smith DE et al. Homocysteine affects cardiomyocyte viability: concentration-dependent effects on reversible flip-flop, apoptosis and necrosis. *Apoptosis* 2007; 12: 1407–18.
45. Handy DE, Castro R, Loscalzo J. Epigenetic modifications: Basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* 2011; 123: 2145–56 .
46. Cacciapuoti F. Hyper-homocysteinemia: a novel risk factor or a powerful marker for cardiovascular diseases? Pathogenetic and therapeutical uncertainties. *J Thromb Thrombolysis* 2011; 32: 82–8.
47. NiesenMI, Osborne AR, Yang H, Rastogi S, Chellappan S, Cheng JQ et al. Activation of a methylated promoter mediated by a sequence-specific DNA-binding protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 38914–22.
48. Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP et al. Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 2008; 452: 112–5.
49. Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Peron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008; 452: 45–50.
50. Ingrosso D, Perna AF. Epigenetics in hyperhomocysteinemic states: a special focus on uremia. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 892–9.
51. Jamaluddin MS, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia, DNA methylation and vascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1660–6.

52. Kalani A, Kamat PK, Tyagi SC, Tyagi N. Synergy of homocysteine, microRNA, and epigenetics: a novel therapeutic approach for stroke. *Mol Neurobiol* 2013; 48:157–68.
53. Selhub J, Paul L. Folic acid fortification: why not vitamin B12 also? *Biofactors* 2011; 37: 269–71.
54. McCully KS. Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: (Suppl 1): 1563–8.
55. Woodward M, Rumley A, Rumley A, Rumley C, Lewington S, Morrison CE, Lowe GD. The association between homocysteine and myocardial infarction is independent of age, sex, blood pressure, cholesterol, smoking and markers of inflammation: the Glasgow Myocardial Infarction Study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006; 17: 1–5.
56. Al-Obaidi MK, Stubbs PJ, Amersey R, Noble MI. Acute and convalescent changes in plasma homocysteine concentrations in acute coronary syndromes. *Heart* 2001; 85: 380–4.
57. Osorio A, Ortega E, Ruiz-Requena E. Two models of homocysteine behavior in acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2008; 41: 277–81.
58. Beletić A, Mirković D, Antonijević N, Jakovljević B, Peruničić J, Ilić M, Vasiljević Z, Majkić-Singh N. Incidence of hyperhomocysteinemia among patients with acute myocardial infarction younger than 45 years. *J Med Biochem* 2007; 26: 38–41.
59. Konkle BA, and Al Schafer (2008) Hemostasis, thrombosis, fibrinolysis and cardiovascular disease; homocysteine. Y: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. Braunwald's Heart Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2008: 2077–8.
60. Den Heijer M, Lewington S, and R Clarke. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a metaanalysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 292–9.
61. Hirmerová J. Homocysteine and venous thromboembolism – Is there any link? *Cor et Vasa* 2013; 55: 248–58.



62. Radovanović N, Antonijević N, Beletić A, Peruničić J, Kočica M, Mirković D, Lačković V, Lačković M. Hyperhomocysteinemia in patients with pulmonary embolism. *Arch Biol Sci* 2010; 62: 907–14.
63. Fukami A, Adachi H, Hirai Y, Enomoto M, Otsuka M, Nanjo Y et al. High levels of plasma homocysteine predicts development of hypertension in a general population: the Tanushimaru study. *J Epidemiol Community Health* 2011; 65: 245–7.
64. Bogdanski P, Miller-Kasprzak E, Pupek-Musialik D, Jablecka A, Lacinski M, Jagodzinski P, Jakubowski H. Plasma total homocysteine is a determinant of carotid intima-media thickness and circulating endothelial progenitor cells in patients with newly diagnosed hypertension. *Clin Chem Lab Med*. 2012; 50: 1107–13.
65. Joseph J, Handy DE, Loscalzo J. Quo vadis: whither homocysteine research? *Cardiovasc Toxicol* 2009; 9: 53–63.
66. Clarke R, Halsey J, Bennett D, Lewington S. Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials. *J Inher Metab Dis* 2011; 34: 83–91.
67. Smulders YM, Blom HJ. The homocysteine controversy. *J Inher Metab Dis* 2011; 34: 93–9.
68. Ueland PM, Loscalzo J. Homocysteine and cardiovascular risk: the perils of reductionism in a complex system. *Clinical Chemistry* 2012; 58: 1623–5.
69. Pezzini A, Grassi M, Del Zotto E, Assanelli D, Archetti S, Negrini R et al. Interaction of homocysteine and conventional predisposing factors on risk of ischaemic stroke in young people: consistency in phenotype-disease analysis and genotype-disease analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 1150–6.
70. Casas JP, Bautista LE, Smeeth L, Sharma P, Hingorani AD. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. *Lancet* 2005; 365: 224–32.

71. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/ American Stroke Association. *Stroke* 2014; [Epub ahead of print] Доступно на <http://stroke.ahajournals.org/content/early/2014/04/30/STR.00000000000000024>. Приступано 15. маја 2014.
72. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 368–76.
73. O'Suilleabhain PE, Oberle R, Bartis C, Dewey RB Jr, Bottiglieri T, Diaz-Arrastia R. Clinical course in Parkinson's disease with elevated homocysteine. *Parkinsonism Relat Disord* 2006; 12: 103–7.
74. Herrmann W, Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 435–41.
75. Hooshmand B, Polvikoski T, Kivipelto M, Tanskanen M, Myllykangas L, Erkinjuntti T. Plasma homocysteine, Alzheimer and cerebrovascular pathology: a population-based autopsy study. *Brain* 2013; 136: 2707–16.
76. Hachinski V, Sposato LA. Dementia: from muddled diagnoses to treatable mechanisms. *Brain* 2013; 136: 2652–4.
77. Cacciapuoti F. Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Thromb Thrombolysis* 2013; 36: 258–62.
78. Gu P, Defina LF, Leonard D, John S, Weiner MF, Brown ES. Relationship between serum homocysteine levels and depressive symptoms: the Cooper Center Longitudinal Study. *J Clin Psychiatry* 2012; 73: 691–5.
79. Gariballa S. Testing homocysteine-induced neurotransmitter deficiency, and depression of mood hypothesis in clinical practice. *Age Ageing* 2011; 40: 702–5.

80. Munjal C, Givvimani S, Qipshidze N, Tyagi N, Falcone JC, Tyagi SC. Mesenteric vascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Biochem.* 2011; 348: 99–108.
81. Givvimani S, Munjal C, Narayanan N, Aqil F, Tyagi G, Metreveli N, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia decreases intestinal motility leading to constipation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: 281–90.
82. Oussalah A, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. Meta-analysis: hyperhomocysteinaemia in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 1173–84.
83. Vacek TP, Kalani A, Voor MJ, Tyagi SC, Tyagi N. The role of homocysteine in bone remodeling. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 579–90.
84. Hofmann MA, Kohl K, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkels A, Amira J, Fiehn W, Ziegler R, Wahl P, et al. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *Diabetes Care* 1997; 20: 1880–6.
85. Poirier LA, Brown AT, Fink LM, Wise CK, Randolph CJ, Delongchamp RR, Fonseca VA. Blood S-adenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism* 2001; 50: 1014–8.
86. Robillon JF, Canivet B, Candito M, Sadoul JL, Jullien D, Morand P, Chambon P, Freychet P. Type 1 diabetes mellitus and homocyst(e)ine. *Diabete Metab* 1994; 20: 494–6.
87. Tessari P, Coracina A, Kiwanuka E, Vedovato M, Vettore M, Valerio A, Zaramella M, Garibotto G. Effects of insulin on methionine and homocysteine kinetics in type 2 diabetes with nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 2968–76.
88. Abais JM, Xia M, Li G, Gehr TW, Boini KM, Li PL. Contribution of endogenously produced reactive oxygen species to the activation of podocyte NLRP3 inflammasomes in hyperhomocysteinemia. *Free Radic Biol Med* 2014; 67: 211–20.

89. de Koning L, Hu FB. Homocysteine lowering in end-stage renal disease: is there any cardiovascular benefit? *Circulation* 2010; 121: 1379–81.
90. Wu CC, Zheng CM, Lin YF, Lo L, Liao MT, Lu KC. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clin Biochem* 2012; 45: 1286–94.
91. Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, Lippi G, Nybo M. Standardization of collection requirements for fasting samples. *Clin Chim Acta* 2013; [Epub ahead of print]Доступно на <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.11.008>. Приступано 15. маја 2014.
92. Klykov CM, Lentz SR. Trends in clinical laboratory homocysteine testing from 1997 to 2010: the impact of evidence on clinical practice at a single institution. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 671–5.
93. Global initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management and prevention of COPD (Updated 2014). Доступно на [http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD\\_Report\\_2014\\_Jan23.pdf](http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2014_Jan23.pdf). Приступано 17. маја 2014.
94. Halbert RJ, Isonaka S, George D, Iqbal A. Interpreting COPD prevalence estimates: what is the true burden of disease? *Chest* 2003; 123: 1684–92.
95. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2012; 379: 1341–51.
96. Национални водич добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење хроничне опструктивне болести плућа. Доступно на <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/Novembar/VodicZaDijagnostikovanjeiLecenjeHronicneOpstruktivneBolestiPluca.pdf>. Приступано 17. маја 2014.
97. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977;1: 1645–8.
98. Kueppers F, Miller RD, Gordon H, Hepper NG, Offord K. Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study. *Am J Med* 1977; 63: 336–42.

99. Cohen BH. Chronic obstructive pulmonary disease: a challenge in genetic epidemiology. *Am J Epidemiol* 1980; 112: 274–88.
100. Sampsonas F, Karkoulas K, Kaparianos A, Spiropoulos K. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Curr Med Chem*. 2006; 13: 2857–73.
101. de Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med* 2014; [Epub ahead of print]. Доступно на <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12239>. Приступано 7. маја 2014.
102. Brode SK, Ling SC, Chapman KR. Alpha-1 antitrypsin deficiency: a commonly overlooked cause of lung disease. *Can Med Assoc J* 2012; 184: 1365–71.
103. Beletić A, Dudvarski-Ilić A, Milenković B, Nagorni-Obradović Lj, Ljujić M, Đordjević V, Radojković D, Majkić-Singh N. Alpha-1-antitrypsin deficiency- molecular basis, clinical presentation, therapeutic options and an integrative approach in diagnostics. *J Med Biochem* 2014; 33: 88–96.
104. Filipović M, Đinđić B, Cekić S. Patogeneza hronične opstruktivne bolesti pluća. *Acta Med Median* 2006; 45: 73–81.
105. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; 378: 1015–26.
106. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 2000; 117(Suppl 1): 303–17.
107. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J* 2008; 31: 1334–56.
108. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672–88.
109. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 456–68.

110. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359: 2355–65.
111. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 991–8.
112. Hurst JR, Vestbo Jr, Anzueto A, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1128–38.
113. Gooptu B, Lomas DA. Conformational Pathology of the Serpins: Themes, Variations and Therapeutic Strategies. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 147–76.
114. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of  $\alpha$ 1-antitrypsin and its role in health and disease. *Resp Med* 2011; 105: 1129–39.
115. Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003; 52: 95–100.
116. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 195–207.
117. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 258–66.
118. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006; 28: 219–42.
119. Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57(Suppl 1): 189–204.
120. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 1114–21.

121. Wedzicha JA, Brill SE, Allinson JP, Donaldson GC. Mechanisms and impact of the frequent exacerbator phenotype in chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med.* 2013; 11: 181.
122. Decramer M, Rennard S, Troosters T, et al. COPD as a lung disease with systemic consequences-clinical impact, mechanisms and potential for early intervention. *COPD* 2008; 5: 235–56.
123. Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, et al. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 204–12.
124. Ukena C, Mahfoud F, Kindermann M, Kindermann I, Bals R, Voors AA et al. The cardiopulmonary continuum systemic inflammation as 'common soil' of heart and lung disease. *Int J Cardiol* 2010; 145: 172–6.
125. Bhatt SP, Dransfield MT. Chronic obstructive pulmonary disease and cardiovascular disease. *Transl Res* 2013; 162: 237–51.
126. Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, et al. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Ann Intern Med* 2005; 142: 233–9.
127. Andersson A, Ankerst J, Lindgren A, Larsson K, Hultberg B. Hyperhomocysteinemia and changed plasma thiol redox status in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 229–33.
128. Kai S, Nomura A, Morishima Y, Ishii Y, Sakamoto T, Hegab AE, Sekizawa K. The effect of smoking-related hyperhomocysteinemia on spirometric declines in chronic obstructive pulmonary disease in elderly Japanese. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42: 117–24.
129. Seemungal TA, Lun JC, Davis G, Neblett C, Chinyepi N, Dookhan C et al. Plasma homocysteine is elevated in COPD patients and is related to COPD severity. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007; 2: 313–21.

130. Fimognari FL, Loffredo L, Di Simone S, Sampietro F, Pastorelli R, Monaldo M et al. Hyperhomocysteinaemia and poor vitamin B status in chronic obstructive pulmonary disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19: 654–9.
131. Hirayama F, Lee AH, Terasawa K, Kagawa Y. Folate intake associated with lung function, breathlessness and the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2010; 19: 103–9.
132. Andersson I, Grönberg A, Slinde F, Bosaeus I, Larsson S. Vitamin and mineral status in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Respir J* 2007; 1: 23–9.
133. McNulty H, Scott JM. Intake and status of folate and related B-vitamins: considerations and challenges in achieving optimal status. *British Journal of Nutrition* 2008; 99: Suppl 3: 48–54.
134. Guéant JL, Alpers DH. Vitamin B12, a fascinating micronutrient, which influences human health in the very early and later stages of life. *Biochimie* 2013; 95: 967–9.
135. Dudman NPB. An alternative view of homocysteine. *Lancet* 1999; 354: 2072–4.
136. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, McElvaney NG. Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest* 2004; 125: 1952–7.
137. Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, Stewart S, Janciauskiene S, Kelley DG et al. Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol* 2005; 166: 377–86.
138. Hill AT, Bayley DL, Campbell EJ, Hill SL, Stockley RA. Airways inflammation in chronic bronchitis: the effects of smoking and alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2000; 15: 886–90.



139. Alam S, Li Z, Atkinson C, Jonigk D, Janciauskiene S, Mahadeva R. Z  $\alpha$ 1-Antitrypsin Confers a Proinflammatory Phenotype That Contributes to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189: 909–31.
140. Fulop T Jr, Larbi A, Fortun A, Robert L, Khalil A. Elastin peptides induced oxidation of LDL by phagocytic cells. *Pathol Biol* 2005; 53: 416–23.
141. Đorđević V, Pruner I, Radojković D. Molecular basis of thrombophilia. *J Med Biochem* 2014; 33: 22–7.
142. Djordjevic V, Rakicevic LJ, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Radojkovic D Savic A. Prevalence of factor V Leiden, factor V Cambridge, factor II G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations in healthy and thrombophilic Serbian populations. *Acta Haematol* 2004; 112: 227–9.
143. Белетић А. Примена интегративног алгорита у дијагностици дефицијенције алфа-1-антитрипсина [специјалистички рад]. Београд, Србија: Универзитет у Београду; 2012.
144. <http://supa.pharmacy.bg.ac.rs/courses/33/posts>. Приступано 15. маја 2014.
145. Castro R, Rivera I, Blom HJ, Jakobs C, Travares de Almeida I. Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinaemia and vascular disease: an overview. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 3–20.
146. Božič-Mijovski M. Hyperhomocysteinemia and thrombophilia. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(Suppl 1): 89–95.
147. Den Heijer M, Lewington S, R Clarke. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a metaanalysis of published epidemiological studies. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 292–9.

148. Antonijević N, Beletić A, Mirković D, Sango V, Novaković I, Djordjević V, Obradović S, Perunić J, Jakovljević B, Vasiljević Z. Incidence of hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase 677 genotypes in patients with pulmonary thromboembolism. *Eur Heart J* 2007; 8 (Abs Suppl):181.
149. Vučković BA, Čabarkapa VS, Ilić TA, Salatić IR, Lozanov-Crvenković ZS, Mitić GP. Clinical significance of determining plasma homocysteine: case-control study on arterial and venous thrombotic patients. *Croat Med J* 2013; 54: 480–8.
150. Beletić A, Mirković D, Antonijević N, Đorđević V, Šango V, Jakovljević B, Perunić J, Ilić M, Vasiljević Z, Majkić-Singh N. Incidence of hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T polymorphism among young patients with acute myocardial infarction. *J Med Biochem* 2009; 28: 41–5.
151. Kölling K, Ndrepepa G, Koch W, Braun S, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms, plasma homocysteine, folate and vitamin B<sub>12</sub> levels and the extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1201–6.
152. WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2012. Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO\\_NMH\\_NHD\\_EPG\\_12.1\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO_NMH_NHD_EPG_12.1_eng.pdf). Приступано 10. априла 2014.
153. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B<sub>12</sub> deficiencies. *Food and Nutrition Bulletin* 2008; 29: Suppl 2: 238–44.
154. Stanojković I, Kotur-Stevuljević J, Milenković B, Spasić S, Vujčić T, Stefanović A et al. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation. *Respir Med* 2011; 105: Suppl 3: 31–7.

155. Beletić A, Mirković D, Dudvarski-Ilić A, Milenković B, Nagorni-Obradović Lj, Đorđević V, Ignjatović S, Majkić-Singh N. Questionable reliability of homocysteine as the metabolic marker for folate and vitamin b12 deficiency in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Med Biochem* [Epub ahead of print]. Доступно на <http://dx.doi.org/10.2478/jomb-2014-0046>. Приступано 3. јуна 2014.
156. Fregonesea L, Stolka J, Frants RR, Veldhuisen B. Alpha-1 antitrypsin Null mutations and severity of emphysema. *Resp Med* 2008; 102: 876–84.
157. Stoller JK, Brantly M. The challenge of detecting alpha-1 antitrypsin deficiency. *COPD* 2013; 10(Suppl1): 26–34.
158. Topic A, Stankovic M, Divac-Rankov A, Petrovic-Stanojevic N, Mitic-Milicic M, Nagorni-Obradovic L, Radojkovic D. Alpha-1-antitrypsin deficiency in Serbian adults with lung diseases. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16: 1282–6.
159. Corda L, Bertella E, Pini L, Pezzini A, Medicina D, Boni E, et al. Diagnostic flow chart for targeted detection of alpha1-antitrypsin deficiency. *Resp Med* 2006; 100: 463–70.
160. Salahuddin P. Genetic Variants of  $\alpha$ 1-Antitrypsin. *Curr Prot Pept Sc* 2010; 11: 101–7.
161. Topic A, Jelic Z, Ilic A. A case of severe alpha-1 antitrypsin deficiency associated with the rare Pi MmaltonZ genotype. *Balkan J Clin Lab* 1995; 2: 95.
162. Prins J, van der Meijden BB, Kraaijenhagen RJ, Wielders JPM. Inherited Chronic Obstructive Pulmonary Disease: new selective-sequencing workup for  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency identifies 2 previously unidentified Null alleles. *Clin Chem* 2008; 54: 101–7.
163. Beletic A, Dudvarski-Ilic A, Milenkovic B, Nagorni-Obradovic Lj, Ljujic M, Djordjevic V, Mirkovic D, Radojkovic D, Majkic-Singh N. Is an integrative laboratory algorithm more effective in detecting alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with premature chronic obstructive

- pulmonary disease than AAT concentration based screening approach?  
*Bioch Med* 2014; 24: 293–8.
164. Flotte TR, Mueller C. Gene therapy for alpha-1-antitrypsin deficiency.  
*Hum. Mol. Genet* 2011; 20: 87–92.
165. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 250–5.
166. Rosenberg SR, Kalhan R. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Translational Research* 2012; 159: 228–37.
167. Folsom AR, Desvarieux M, Nieto FJ, Boland LL, Ballantyne CM, Chambless LE. B vitamin status and inflammatory markers. *Atherosclerosis* 2003; 169: 169–74.
168. Reilly R, McNulty H, Pentieva K, Strain JJ, Ward M. MTHFR 677TT genotype and disease risk: is there a modulating role for B-vitamins? *Proc Nutr Soc* 2014; 73: 47–56.
169. Cavallès A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S et al. Comorbidities of COPD. *Eur Respir Rev* 2013; 22: 454–75.
170. Tillie-Leblond I, Marquette CH, Perez T, Scherpereel A, Zanetti C, Tonnel AB, Remy-Jardin M. Pulmonary embolism in patients with unexplained exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: prevalence and risk factors. *Ann Intern Med* 2006; 144: 390–6.
171. Gunen H, Gulbas G, In E, Yetkin O, Hacievliyagil SS. Venous thromboemboli and exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2010; 35: 1243–8.
172. Izquierdo JL, Martínez A, Guzmán E, de Lucas P, Rodríguez JM. Lack of association of ischemic heart disease with COPD when taking into account classical cardiovascular risk factors. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2010; 5: 387–94.

173. Nunomiya K1, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K et al. Hyperhomocysteinaemia predicts the decline in pulmonary function in healthy male smokers. *Eur Respir J* 2013; 42: 18–27.
174. Folchini F, Nonato NL, Feofiloff E, D'Almeida V, Nascimento O, Jardim JR. Association of oxidative stress markers and C-reactive protein with multidimensional indexes in COPD. *Chron Respir Dis* 2011; 8: 101–8.

## Биографија

Анђело Белетић је рођен 10.01.1978. у Београду. Основну школу и Гимназију је завршио у Краљеву. На Фармацеутски факултет Универзитета у Београду се уписао школске 1996/97. године и дипломирао 25.01.2002. са просечном оценом 9,31.

Од 04.02.2002. до 30.09.2003. био је запослен на Институту (сада Катедра) за медицинску биохемију Фармацеутског факултета у Београду, Од 04.01.2004. ради у Институту (сада Центар) за медицинску биохемију Клиничког центра Србије.

Школске 2008/2009. године уписао је специјалистичке студије из Медицинске биохемије на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду. Специјалистички испит положио 15.06.2012. са одличним успехом. На докторске академске студије из Медицинске биохемије на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду пребачен је са магистарских последипломских студија школске 2006/2007. године.

Активно учествује у раду иностраних и домаћих удружења из области клиничке хемије и лабораторијске медицине. У оквиру European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) ангажован је као Young Scientist Member у Working Group Congresses and Postgraduate Education (WG CPE). Члан је Друштва медицинских биохемичара Србије (ДМБС), у коме обавља функцију председника Комитета за унапређење рада подмлатка ДМБС и учествује у раду више Комитета. Представник је Коморе биохемичара Србије у Програмском савету Центра за развој фармацеутске и биохемијске праксе Фармацеутског факултета Универзитета у Београду.

Објавио је 10 научних радова штампаних у целини и више од 40 саопштења са међународних и домаћих скупова штампаних у изводу. Од јуна 2013. године обавља дужност помоћног уредника часописа *Biochemia Medica*, а такође је и рецензент у часописима *Journal of Medical Biochemistry* и *Molecular Biology Reports*.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Анђело Белетић

број индекса 62/06

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

УТИЦАЈ НАСЛЕДНИХ И СТЕЧЕНИХ ФАКТОРА НА НИВО ХОМОЦИСТЕИНА У  
КРВИ БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНОМ ОПСТРУКТИВНОМ БОЛЕШЋУ ПЛУЋА

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

Потпис докторанда

У Београду, 5. јун 2014.



---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Анђело Белетић

Број индекса 62/06

Студијски програм Докторске академске студије из Медицинске биохемије

Наслов рада УТИЦАЈ НАСЛЕДНИХ И СТЕЧЕНИХ ФАКТОРА НА НИВО ХОМОЦИСТЕИНА У КРВИ БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНОМ ОПСТРУКТИВНОМ БОЛЕШЋУ ПЛУЋА

Ментор Др Душко Мирковић, ванредни професор, Универзитет у Београду- Фармацеутски факултет

Потписани/а Анђело Белетић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 5. јун 2014.



---



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

УТИЦАЈ НАСЛЕДНИХ И СТЕЧЕНИХ ФАКТОРА НА НИВО ХОМОЦИСТЕИНА У  
КРВИ БОЛЕСНИКА СА ХРОНИЧНОМ ОПСТРУКТИВНОМ БОЛЕШЋУ ПЛУЋА

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 5. јун 2014.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.