

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jasmina M. Ivanišević

**ISPITIVANJE POKAZATELJA INFLAMACIJE,
OKSIDATIVNOG STRESA I LIPIDNOG
STATUSA KOD PACIJENATA SA
SARKOIDOZOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jasmina M. Ivanišević

**THE EXAMINATION OF INFLAMMATORY,
OXIDATIVE STRESS AND LIPID STATUS
PARAMETERS IN SARCOIDOSIS PATIENTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

Dr. Zorana Jelić Ivanović, redovni profesor (mentor)

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr. Jelena Kotur Stevuljević, vanredni profesor (mentor)

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr. Aleksandra Stefanović, docent

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr. Jelena Vekić, docent

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr. Violeta Vučinić Mihailović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta pod mentorstvom prof. dr Zorane Jelić Ivanović i prof. dr Jelene Kotur Stevuljević.

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru prof. dr Zorani Jelić Ivanović na svim savetima i sugestijama, ukazanoj podršci, posvećenom vremenu, velikom razumevanju i strpljenju u svim fazama izrade i pisanja doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Jeleni Kotur Stevuljević za izuzetno razumevanje, sve korisne sugestije i pomoć tokom svih ovih godina našeg zajedničkog rada. Prof. Kotur Stevuljević se zahvaljujem i zbog neiscrpne energije i stalnog podsticaja da istrajem u svom radu.

Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Aleksandri Stefanović na svim savetima i sugestijama koje mi je ukazala u svim fazama izrade doktorske disertacije, kao i za svu nesebičnu pomoć, entuzijazam, podršku i razumevanje koje mi je pružila tokom svih prethodnih godina našeg rada.

Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Jeleni Vekić za sve stručne savete i značajne ideje koje mi je nesebično pružila tokom izrade doktorske disertacije, a posebno za bezrezervnu podršku i razumevanje.

Najiskrenije se zahvaljujem prof. dr Violeti Vučinić Mihailović na stručnim savetima i sugestijama, ukazanom poverenju, ostvarenoj saradnji i velikom razumevanju prilikom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Slavici Spasić koja je dala veliki doprinos mom profesionalnom usavršavanju, na svim njenim stručnim idejama i savetima, toplom i prijateljskom stavu. Prof. Spasić se naročito zahvaljujem zbog nesebične pomoći koju mi je pružila u određenim teškim trenucima.

Prof. dr Vesni Spasojević Kalimanovskoj se iskreno zahvaljujem na svim sugestijama, velikoj podršci, razumevanju i pomoći koje mi je ukazala tokom svih ovih godina.

*Zahvalnost dugujem doc. dr Aleksandri Zeljković koja je svojim stručnim savetima, podrškom i uloženi-
m trudom značajno doprinela izradi ove disertacije.*

Posebnu zahvalnost upućujem svojim dragim kolegama Mironu Sopiću, Tamari Gojković, Milici Miljković, Jeleni Joksić, Sandri Vladimirov, Jeleni Janać i Aleksandri Vukašinović za svesrdnu podršku, kolegijalnost, ogromno razumevanje koji su mi omogućili da istrajem u svom radu.

Zahvaljujem se svim kolegama sa Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta za podršku, razumevanje i prijateljsku atmosferu u svakodnevnom radu.

Naročitu zahvalnost dugujem svojim roditeljima na beskrajnoj ljubavi i razumevanju, uloženom trudu i bezrezervnoj podršci koji su mi davali snagu i inspiraciju da istrajem na svom putu bez obzira na sve padove i teške trenutke, a koji su bili neminovni ne samo tokom izrade doktorske disertacije nego tokom celog mog ličnog i profesionalnog razvoja, sazrevanja i napretka.

Ispitivanje pokazatelja inflamacije, oksidativnog stresa i lipidnog statusa kod pacijenata sa sarkoidozom

Rezime

Sarkoidoza je inflamatorno oboljenje ismatra se da genetska predispozicija organizma i specifični agensi iz spoljašnje sredine igraju značajnu ulogu u prekomernoj aktivaciji imunskog sistema koji se nalazi u osnovi oboljenja. Među agensima iz spoljašnje sredine, mikobakterijski antigeni imaju najveći značaj. Novije publikacije govore o postojanju mikobakterijskog antigena - katalaza-peroksidaza (mKatG) u sarkoidnim granulomima. Smatra se da ovaj antigen dovodi do stimulacije imunskog odgovora i tako doprinosi inicijaciji oboljenja.

Imunološki odgovor započinje akumulacijom aktiviranih T pomoćničkih ("helper") limfocitai makrofaga na mestima inflamacije. Usled kompleksnih interakcija T limfocita i makrofaga, formira se sarkoidni granulom. Granulomi su sastavljeni od visoko-diferentovanih mononuklearnih fagocita i limfocita. Aktivirane ćelije imunskog sistema proizvode različite proinflamatorne medijatore među kojima su značajni interleukin (IL) -2, IL-12, IL-15, faktor nekroze tumora α (TNF α), angiotenzin konvertujući enzim (ACE). C-reaktivni protein (CRP) kao inflamatorni marker se takođe povećano sintetise u jetri kao odgovor na povećanu produkciju proinflamatornih citokina, ali nije dokazano da on može da posluži kao koristan marker za procenu aktivnosti bolesti. U kliničkoj dijagnozi granulomatoznih oboljenja izdvojio se ACE, ali su utvrđeni nedostaci i ovog parametra. Noviji radovi naglašavaju značaj serumskog amiloida A (SAA) kao važnog markera granulomatozne inflamacije jer, osim što predstavlja deo granuloma, on reguliše njegovo formiranje, ali utiče i na produkciju citokina. Sinteza SAA se povećava u jetri i oslobađa se zajedno sa CRP-om pod uticajem IL-1 i IL-6.

Sarkoidoza se prema toku može podeliti na akutnu ili hroničnu, a manifestacije mogu da budu plućne i/ili vanplućne. Akutna bolest je ograničenog toka, sa čestim spontanim remisijama dok hronična perzistira i praćena je progresijom oboljenja. Pored pluća, mogu biti zahvaćeni srce, oči, nervni system, mišići, kostii drugi organi. Vanplućna manifestacija koja uglavnom uključuje i plućno tkivo predstavlja teži oblik od isključivo plućne manifestacije.

Poznato je da se u inflamatornim stanjima povećava nivo oksidativnog stresa i smanjuje nivo antioksidativne zaštite. Inflamatorne ćelije pojačano stvaraju superoksid anjon radikal (O_2^-) koji se konvertuje do vodonik-peroksida (H_2O_2). Dejstvom oksidanasa na lipidne molekule najpre se generišu lipidni hidroperoksidi, dok u krajnjem stadijumu lipidne peroksidacije nastaje

malondialdehid (MDA). Pored MDA, danas se značaj daje i kombinovanim parametrima kao što je totalni oksidantni status (TOS), čije su glavne komponente lipidni hidroperoksidi i H_2O_2 . Različiti enzimski i neenzimski antioksidansi učestvuju u neutralizaciji činilaca oksidativnog stresa. Među enzimskim antioksidansima mogu da se izdvoje superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutatation-peroksidaza, a među neenzimskim sulfhidrilne (SH) grupe, glutatation (GSH), mokraćna kiselina, vitamini C i E. Razvijena je i metoda kojom se određuje totalni antioksidantni status (TAS) u čiji sastav ulaze proteinske SH-grupe, mokraćna kiselina, vitamin C, ukupni bilirubin, vitamin E i drugi antioksidansi. Još jedan noviji parametar je prooksidantno-antioksidantni balans (PAB) koji služi kao mera oksidanasa u antioksidantnom okruženju. Smanjenje neenzimskih antioksidanasa, povećanje ukupnih hidroperoksida i 8-izoprostana, kao i smanjenje kofaktora NADPH u eritrocitima su do sad dokumentovani kod pacijenata sa sarkoidozom.

Inflamatorni procesi u sarkoidozi mogu da dovedu i do promena u metabolizmu lipoproteinskih čestica bogatih trigliceridima ili da smanje kapacitet lipoproteinskih čestica visoke gustine (HDL) u efluksu holesterola, što se manifestuje promenama u lipidnom statusu. Inflamacija i oksidativni stres favorizuju nastanak malih, gustih LDL i HDL čestica. U ovakvim patološkim stanjima, moguća je i izmena proteina HDL-a drugim proteinima, pri čemu se smanjuje funkcionalnost HDL čestica i ubrzava njihov katabolizam. Smanjenje koncentracija ukupnog holesterola (UH) i HDL-H ili značajno smanjenje samo HDL-H je utvrđeno kod pacijenata sa sarkoidozom. Do sad je publikovana jedna studija koja govori o promenama u distribuciji HDL subfrakcija u sarkoidozi, koja pokazuje da je smanjen sadržaj holesterola u većim HDL2 subfrakcijama i povećan udeo manjih HDL 3 čestica. Među proteinima HDL čestica, naročito značaj je dat enzimu paraoksonazi 1 (PON1) jer se smatra da on ima ključnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti pošto ima sposobnost razgradnje biološki oksidovanih lipida. Do sada je u samo jednoj studiji ispitivan nivo PON1 u sarkoidozi i utvrđeno je sniženje enzimske aktivnosti.

Ciljevi istraživanja su bili da se ispita inflamatorni status, oksidativno-stresni status u serumu i eritrocitima, lipidni status, raspodela LDL i HDL subfrakcija, kao i PON1 status kod pacijenata sa sarkoidozom u odnosu na grupu zdravih ispitanika, kao i između različitih tokova/manifestacija bolesti. Nadalje, cilj je bio i da se utvrdi međusobna povezanost navedenih parametara, kao i da se ispita koji od njih može da bude nezavisni prediktor drugih parametara

odnosno samog oboljenja. Takođe, određena je i dijagnostička tačnost parametara oksidativno-stresnog i lipidnog statusa kao prediktora postojanja bolesti.

U ispitivanju je učestvovalo 213 pacijenata sa sarkoidozom i 139 zdravih osoba. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i odobrena od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije i Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Biohemijski parametri su određeni u serumu, plazmi i hemolizatima eritrocita. Koncentracije osnovnih biohemijskih i lipidnih parametara su određene rutinskim laboratorijskim metodama, koncentracija hsCRP-a pomoću imunoturbidimetrijske metode, aktivnost ACE kolorimetrijskom metodom. SAA je određen primenom ELISA testa. Parametri oksidativno-stresnog statusa i PON1 su izmereni odgovarajućim spektrofotometrijskim metodama. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija je rađeno gradijent gel elektroforezom, a kvantifikacija je izvršena denzitometrijski. Određeni su i parametri plućne funkcije kod pacijenata.

Rezultati pokazuju da su koncentracije hsCRP-a, UH, eritrocitnog TOS-a ($P < 0,05$), relativnog udela LDL IVA, HDL 2a i HDL 3a subfrakcija ($P < 0,01$), kao i SAA, TG, TG/HDL-H, relativnog udela LDL II i LDL III subfrakcija ($P < 0,001$), serumskih koncentracija MDA, TOS-a, PAB-a, eritrocitnih koncentracija MDA, O_2^- , SH grupa ($P < 0,0001$) značajno veće, dok su koncentracije HDL-H, eritrocitne aktivnosti SOD-a ($P < 0,01$), serumskih koncentracija SH grupa, relativnog udela LDL I subfrakcija ($P < 0,001$), serumskih koncentracija TAS-a i aktivnosti SOD ($P < 0,0001$) značajno manje kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. U grupi pacijenata bilo je više značajnih korelacija između parametara oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima. Serumski ($P < 0,001$) i eritrocitni ($P < 0,001$) MDA su se pokazali kao najbolji prediktori oboljenja među drugim parametrima oksidativno-stresnog statusa. Oba parametra su zadržala svoju prediktivnu sposobnost i nakon podešavanja za druge parametre oksidativno-stresnog statusa (S-MDA, $P < 0,01$; H-MDA, $P < 0,001$), kao i za lipidne parametre (S-MDA, $P < 0,01$; H-MDA, $P < 0,01$). S-MDA je imao izvanrednu ($AUC = 0,995$), a S-TOS odličnu ($AUC = 0,810$) dijagnostičku tačnost. Modeli sačinjeni od kombinacije više oksidanasa i/ili antioksidanasa su imali bolji potencijal razdvajanja u odnosu na pojedinačne parametre. Pokazalo se da je POazna aktivnost bila značajno niža kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,001$), dok je DZOaza takođe bila niža, ali razlika nije dostigla značajnost. U grupi pacijenata, uočene su značajne pozitivne korelacije POazne aktivnosti sa UH ($P < 0,01$), LDL-H i HDL-H ($P < 0,05$), a značajne negativne korelacije DZOazne aktivnosti sa SAA, MDA ($P < 0,05$) i

PAB-om ($P < 0,01$). Utvrđeno je da povećanje u koncentraciji SAA ima nezavistan uticaj na smanjenje DZOazne aktivnosti, kao i da 71% varijacije u DZOaznoj aktivnosti može da se objasni povećanjem koncentracije TOS-a, PAB-a i SAA. Analiza parametara prema tokovima bolesti pokazala je značajno veći udeo LDL IVA ($P < 0,01$) i HDL 3a subfrakcija ($P < 0,05$) i značajno nižu koncentraciju HDL-H ($P < 0,05$) kod hronične sarkoidoze u odnosu na kontrolnu grupu. Trajanje terapije, kao i udeli HDL 3a i HDL 3c su bili značajno nezavisno povezani sa hroničnom sarkoidozom. Relativni udeo HDL 3a subfrakcija, koncentracije PAB-a ($P < 0,05$) i LDL-H ($P < 0,01$) su bile značajno veće, dok su relativni udeo LDL IV, aktivnost DZOaze ($P < 0,05$), koncentracija HDL-H ($P < 0,01$) i HDL dijametar ($P < 0,001$) bili značajno manji kod pacijenata sa izolovanom plućnom manifestacijom u odnosu na zdrave osobe. POaza je bila značajno niža ($P < 0,05$) kod pacijenata sa kombinovanom plućnom i vanplućnom bolešću u poređenju sa isključivo plućnom lokalizacijom. Izolovana plućna manifestacija se karakterisala značajnim korelacijama između relativnih udela HDL subfrakcija i parametara oksidativno-stresnog statusa, a utvrđeno je i da su koncentracija TOS-a i POazna aktivnost ($P < 0,05$) imali nezavistan uticaj na promene u distribuciji malih HDL čestica.

Dobijeni rezultati pokazuju da pacijenti sa sarkoidozom imaju povećane nivoe markera inflamacije, dislipidemiju, povećan oksidativni stres i smanjenu antioksidativnu zaštitu. Inflamatorni procesi su značajno povezani sa oksidativno-stresnim statusom u sarkoidozi. Parametri oksidativnog stresa mogu da budu značajni prediktori oboljenja, a modeli sastavljeni iz njihovih kombinacija imaju bolji potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od zdravih ispitanika u odnosu na pojedinačne parametre. Inflamacija i oksidativni stres mogu da dovedu do modifikacije strukture i funkcije LDL i HDL čestica, što se manifestuje većim relativnim udelima manjih LDL i HDL subfrakcija kao i inverznoj asocijaciji između SAA i oksidativnog stresa sa DZOaznom aktivnošću PON1. Hronični tok sarkoidoze se karakteriše smanjenom koncentracijom HDL-H i manjim HDL česticama. U izolovanoj plućnoj manifestaciji oboljenja utvrđena je značajna povezanost malih HDL česticasa parametrima oksidativno-stresnog statusa i POaznom aktivnošću.

Ključne reči: sarkoidoza; inflamacija; oksidativni stres; antioksidativna zaštita; paraoksonaza 1; lipidi; LDL i HDL subfrakcije; tokovi bolesti; manifestacije bolesti

Naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 616-022:616-008.9:577.115(043.3)

The examination of inflammatory, oxidative stress and lipid status parameters in sarcoidosis patients

Abstract

Sarcoidosis is an inflammatory disease and it has been considered that genetic predisposition and specific environmental agents play significant role in the excessive activation of the immune system that is major characteristic of the disease. Among environmental agents, mycobacterial antigens are thought to be most important. Recent publications reported the presence of mycobacterial antigen catalase-peroxidase (mKatG) in sarcoid granulomas. This antigen leads to immune response stimulation contributing to disease onset.

Immune response begins with accumulation of T helper lymphocytes and macrophages at the sites of inflammation. Complex interactions between lymphocytes and macrophages contribute to granuloma formation. Granulomas consist of highly-differentiated mononuclear phagocytes and lymphocytes. Activated cells of immune system produce different proinflammatory mediators such as interleukin (IL) -2, IL-12, IL-15, tumor necrosis factor α (TNF α), angiotensin converting enzyme (ACE). C-reactive protein (CRP) is synthesized in the liver and its production is increased as a response to proinflammatory cytokines, but the significance of CRP as a useful marker of disease activity has not been proved. ACE became important in clinical diagnosis of granulomatous diseases, but this marker also has its disadvantages. Recent reports pointed out the significance of serum amyloid A (SAA), suggesting it as an important marker of granulomatous inflammation, because it regulates granuloma formation and influences the cytokines production. IL-1 and IL-6 stimulate the increased production of SAA in the liver and its release into the bloodstream together with CRP.

According to disease course, sarcoidosis can be acute or chronic, with disease manifestations on lungs and/or other tissues. Acute disease has limited course and spontaneous remissions often occur, while chronic disease persists and is usually progressive. Besides lungs, other tissues/organs that can be affected are: heart, eyes, nervous system, muscles, bones and others. Combined pulmonary and extrapulmonary manifestations are more severe forms than isolated pulmonary form.

It is well established that, in inflammatory conditions, the levels of oxidative stress increase and the levels antioxidative defence decrease. Inflammatory cells produce superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) that is dismutated into hydrogen peroxide (H_2O_2). Oxidants lead to damage of

lipids generating lipid hydroperoxides and further oxidative modification leads to malondialdehyde (MDA) formation. Besides MDA, total oxidant status (TOS) is a parameter used in determination of oxidative stress whose main components are lipid hydroperoxides and H_2O_2 . Different enzymatic and non-enzymatic antioxidants combat with the excessive oxidative stress. Superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase are typical enzymatic antioxidants, whereas sulfhydryl (SH) groups, glutathione (GSH), uric acid and vitamins C and E are examples of non-enzymatic antioxidants. Total antioxidant status (TAS) is used to measure protein SH groups, uric acid, vitamin C, total bilirubin, vitamin E and other antioxidants. Pro-oxidant antioxidant balance (PAB) also represents new parameter to describe the level of oxidants in an antioxidant environment. Decrease of non-enzymatic antioxidants levels, increase of total hydroperoxides and 8-isoprostanes as well as decrease of NADPH cofactor concentrations in erythrocytes have been reported in sarcoidosis.

Inflammatory processes may significantly influence metabolism of triglyceride (TG)-rich particles or may impair the cholesterol efflux capacity of HDL particles, leading to changes in lipid status. Inflammation and oxidative stress may force the rearrangement of LDL and HDL subclass distributions toward smaller particles. In these pathologic conditions, the replacement of apolipoproteins of HDL particles may occur, contributing to decreased HDL particles functionality and their increased catabolism. Decrease in total cholesterol (TC) and HDL-C or significant decrease of HDL-C have been described in sarcoidosis patients. The only study published so far, concerning alterations in HDL subclasses distribution, reported reduction of the cholesterol content in HDL 2 subfractions and increased distribution of smaller HDL 3 particles. Enzyme paraoxonase 1 (PON1), located on HDL particles, is important because it has the ability to neutralize oxidized lipids. Decreased PON1 in sarcoidosis has been documented in one study.

The aims of our study were to determine markers of inflammatory status, oxidative stress status in serum and erythrocytes, lipid status, LDL and HDL subfractions distribution and PON1 status in patients with sarcoidosis when compared with healthy subjects. These parameters were also compared between different courses/manifestations of the disease. The aim of this study was to explore the relationships between above mentioned parameters as well as to estimate which of them could be independently associated with other parameters or with disease itself. Furthermore, we sought to determine if oxidative stress and lipid status markers could be useful for disease prediction and to establish their diagnostic accuracy in sarcoidosis.

In this study, we included 213 patients with sarcoidosis and 139 healthy controls. The study was planned according to the ethical guidelines stated in Helsinki declaration and was approved by the Ethics Board of Clinical Centre of Serbia and Faculty of Pharmacy University of Belgrade. Biochemical parameters were determined in serum, plasma and erythrocytes hemolysates. The concentrations of basic biochemical and lipid parameters were measured using routine laboratory methods, hsCRP concentration was assayed by immunoturbidimetric method and ACE activity by colorimetric method. SAA concentration was estimated using ELISA test. Oxidative stress status and PON1 status parameters were assayed by spectrophotometric methods. Gradient gel electrophoresis was used to separate LDL and HDL subfractions and relative proportions of the obtained subfractions were quantified by densitometric scanning of the gels. Pulmonary function parameters were measured in the patients.

Our results showed that concentrations of hsCRP, TC, erythrocyte TOS ($P < 0.05$), relative proportions of LDL IVA, HDL 2a and HDL 3a subfractions ($P < 0.01$) as well as SAA, TG, TG/HDL-C, relative proportions of LDL II and LDL III subfractions ($P < 0.001$), serum concentrations of MDA, TOS, PAB, erythrocyte concentrations of MDA, O_2^- , SH groups ($P < 0.0001$) were significantly higher whereas concentrations of HDL-C, erythrocyte SOD activities ($P < 0.01$), serum concentrations of SH groups, relative proportions of LDL I subfraction ($P < 0.001$), serum concentration of TAS and SOD activities ($P < 0.0001$) were significantly lower in the patients compared with the control group. In the patients group, there were more significant correlations of oxidative stress status parameters with inflammatory and lipid status. Serum ($P < 0.001$) and erythrocyte ($P < 0.001$) MDA were shown as the best predictors of disease among the measured oxidative-stress status parameters. Both parameters retained their predictive ability even after adjustment for other parameters of oxidative stress status (S-MDA, $P < 0.01$; H-MDA, $P < 0.001$) and lipid status parameters (S-MDA, $P < 0.01$; H-MDA, $P < 0.01$). S-MDA had outstanding (AUC=0.995) and S-TOS excellent (AUC=0.810) diagnostic accuracy. Models consisted of combined oxidants and/or antioxidants had better discriminative potential when compared with individual parameters. It was demonstrated that POase activity of PON1 was significantly lower in sarcoidosis than in healthy subjects ($P < 0.001$), while DZOase activity was somewhat lower but the difference did not reach the level of statistical significance. Significant positive correlations of POase with TC ($P < 0.01$), LDL-C and HDL-C ($P < 0.05$) were noticed whereas significant negative correlations of DZOase with SAA, MDA ($P < 0.05$) and PAB

($P < 0.01$) were observed in the patients group. We found that increase in SAA concentration was independently associated with the decrease in DZOase activity and that even 71% of variation in DZOase activity may be explained by the variations in TOS, PAB and SAA concentrations. Then, we demonstrated that relative proportions of LDL IVA ($P < 0.01$) and HDL 3a subfractions ($P < 0.05$) were significantly higher and concentration of HDL-C was significantly lower in chronic sarcoidosis than in control group. Duration of therapy, as well as relative proportions of HDL 3a and HDL 3c were independently associated with chronic disease course. Relative proportions of HDL 3a subfractions, concentrations of PAB ($P < 0.05$) and LDL-C concentrations ($P < 0.01$) were significantly higher, while the relative proportions of LDL IV, DZOase activities ($P < 0.05$), concentrations of HDL-C ($P < 0.01$) and dominant HDL diameter ($P < 0.001$) were significantly lower in the patients with isolated pulmonary disease compared with the healthy controls. POase was significantly lower ($P < 0.05$) in patients with combined pulmonary and extrapulmonary form than in patients with pulmonary manifestation. Isolated pulmonary form of sarcoidosis was also characterized by significant correlations between relative proportions of HDL subfractions and oxidative-stress status parameters. It was determined that concentrations of TOS and POase activity ($P < 0.05$) were independently associated with small HDL particles distribution.

The obtained results showed that sarcoidosis patients have increased concentrations of the markers of inflammation, dyslipidemia, increased oxidative stress and decreased antioxidant protection and PON1 levels. Inflammatory processes are significantly associated with oxidative stress status in sarcoidosis. Oxidative stress parameters could be significant disease predictors and models consisted of combined oxidative stress and/or antioxidant protection parameters have better discriminative potential when compared with individual parameters. Inflammation and oxidative stress lead to structural and functional modifications of LDL and HDL particles contributing to the increase in relative proportions of small LDL and HDL subfractions, as well as to the inverse association of SAA and oxidative stress with DZOase. Chronic disease course has been characterized by decreased HDL-C concentrations and the predominance of smaller HDL particles. Significant associations of small HDL particles with oxidative stress status and POase activity have been established in isolated pulmonary form of disease.

Keywords: sarcoidosis; inflammation; oxidative stress; antioxidant protection; paraoxonase 1; lipids; LDL and HDL subfractions; sarcoidosis courses; sarcoidosis manifestations

Scientific field: Medical Biochemistry

UDK number: 616-022:616-008.9:577.115(043.3)

SKRAĆENICE U TEKSTU

ABTS - 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolidin)-6-sulfonat

ACCESS studija – Kontrolisana studija slučaja sarkoidoze (A CaseControl
Etiologic Study of Sarcoidosis)

ACE – angiotenzin konvertujući enzim

ANOVA – analiza varijanse

APĆ – antigen-prezentujuće ćelije

apoA-I – apolipoprotein A-I

apoA-II – apolipoprotein A-II

apoB – apolipoprotein B

APS - amonijum-persulfat

aSAA – forma serumskog amiloida A reaktanta akutne faze

AUC – površina ispod krive (area under the curve)

BHLA - bilateralna hilarna limfadenopatija

CaCl₂ – kalcijum hlorid

CAT – katalaza

CD4+ - klaster diferencijacije 4 (cluster of differentiation 4)

CD8+ - cluster of differentiation 8

CETP – holesterol-estar transferni protein

CH₃COOH – sirćetna kiselina

CH₃COONa – natrijum acetat

CI – interval pouzdanosti (confidence interval)

CMV – Citomegalovirus

CRP – C-reaktivni protein

cSAA – konsitutivna forma serumskog amiloida A

DLCO - difuzni kapacitet pluća za CO

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DTNB - 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeva kiselina

DZOaza – diazoksonaza

DZOazna aktivnost PON1 – diazoksonazna aktivnost PON1

EBV – Epstein-Barr virus

EDTA – etilendiaminotetrasirčetna kiselina

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

FEV₁ - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi

FVC - forsirani vitalni kapacitet

GPx – glutation peroksidaza

GR – glutation reduktaza

GSH – redukovani glutation

H₂O - voda

H₂O₂ – vodonik peroksid

H₂SO₄– sumporna kiselina

HCl – hlorovodonična kiselina

HDL – lipoproteinske čestice visoke gustine (high density lipoproteins)

HDL-H - HDL holesterol

HLA – humani leukocitni antigen

HO·– hidroksilni radikal

hsCRP – visoko osetljivi C-reaktivni protein

IFN γ – interferon γ

IL – interleukin

IMHP - 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin

ITM – indeks telesne mase

IQR – interkvartilni raspon

KVB – kardiovaskularne bolesti

LCAT – lecitinholesterolacil-transferaza

LDL – lipoproteinske čestice niske gustine (low density lipoproteins)

LDL-H – LDL holesterol

LPL – lipoproteinska lipaza

MCP1 – monocit-hemoatraktant protein 1

M-CSF – faktor stimulacije kolonija makrofaga
MDA – malondialdehid
Me - medijana
mKatG – katalaza-peroksidaza antigen mikobakterija
NaCl – natrijum hlorid
NADPH – redukovani nikotinamidadeninukleotid fosfat
NaOH – natrijum hidroksid
NBT - nitroblue-tetrazolijum
NF- κ B – nuklearni faktor κ B
NO – azot monoksid
NO₂ – azot dioksid
O₂⁻ - superoksid anjon radikal
ONOO⁻ - peroksinitritni anjon
OR – odds ratio
PAB – prooksidantno-antioksidantni balans
PAF-AH - acetilhidrolaza faktora agregacije trombocita
PCR – reakcija lančane polimerizacije (polymerase chain reaction)
POaza – paraoksonaza
POazna aktivnost PON1 – paraoksonazna aktivnost PON1
PON1 – paraoksonaza 1
RNK – ribonukleinska kiselina
ROC krive – Receiver Operating Characteristics krive
ROS – reaktivne kiseonične vrste
SAA – serumski amiloid A
SH grupe – sulfhidrilne grupe
SOD – superoksid dizmutaza
TAS – totalni antioksidantni status
TBA - tiobarbiturna kiselina
TCA - trihlorsirćetna kiselina

TEMED - tetrametilen-diamid

TG – trigliceridi

Thlimfocit – T „helper“ (pomoćnički) limfocit

TMB - 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin

TNF α – faktor nekroze tumora α

TOS – totalni oksidantni status

TRIS – Tris(hidroksimetil)aminometan

Trolox - 6- hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina

UH – ukupni holesterol

VLDL - lipoproteinske čestice vrlo niske gustine (very low density lipoproteins)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Sarkoidoza – definicija, istorijat i etiologija	1
1.2. Imunski odgovor u sarkoidozi i formiranje granuloma.....	2
1.3. Klinički tok sarkoidoze	3
1.4. Kliničke manifestacije sarkoidoze	4
1.5. Inflamatorni markeri u sarkoidozi.....	4
1.5.1. Uloga serumskog amiloida A (SAA) u sarkoidozi.....	5
1.6. Oksidativni stres u sarkoidozi	7
1.7. Promene lipidnog statusa u sarkoidozi.....	10
1.7.1. LDL i HDL subfrakcije	11
1.8. Paraoksonaza 1 (PON1)	12
1.8.1. Polimorfizam enzima PON1.....	13
1.8.2. Povezanost HDL čestica, SAA i PON1	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Ispitanici.....	18
3.2. Uzorci	19
3.3. Parametri plućne funkcije.....	20
3.4. Određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih i parametara lipidnog profila	20
3.5. Određivanje markera inflamacije	20
3.5.1. Određivanje hsCRP-a i ACE.....	20
3.5.2. Određivanje koncentracije SAA.....	20
3.6. Određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa	24
3.6.1. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) u serumu i eritrocitima.....	24
3.6.2. Određivanje koncentracije totalnog oksidativnog statusa (TOS) u serumu i eritrocitima.....	25
3.6.3. Određivanje nivoa superoksid-anjon radikala (O_2^-) u hemolizatima eritrocita	26
3.6.4. Određivanje koncentracije prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) u serumu	28
3.6.5. Određivanje koncentracije totalnog antioksidativnog statusa (TAS) u serumu	30
3.6.6. Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih (SH) grupa u plazmi i eritrocitima	31

3.6.7. Određivanje aktivnosti enzima superoksid-dizmutaze (SOD) u plazmi i eritrocitima	32
3.7. Određivanje statusa PON1	34
3.7.1. Određivanje POazne aktivnosti	34
3.7.2. Određivanje DZOazne aktivnosti	36
3.7.3. Određivanje fenotipova enzima PON1	37
3.8. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija	38
3.8.1. Izlivanje kompozitnih gradijent (3-31%) gelova.....	38
3.8.2. Gradijent-gel elektroforeza.....	39
3.8.3. Skeniranje gelova i evaluacija LDL i HDL subfrakcija	39
3.9. Statistička analiza.....	40
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	42
4.1. Osnovni demografski i klinički parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata sa sarkoidozom	42
4.2. Osnovni biohemijski i lipidni parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata sa sarkoidozom	43
4.3. Inflamatorni parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata sa sarkoidozom	44
4.3. Oksidativno-stresni status kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom u serumu i eritrocitima	46
4.3.1. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu kontrolne grupe	47
4.3.2. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu pacijenata.....	50
4.3.3. Poređenje serumskih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između kontrolne grupe i grupe pacijenata	52
4.3.4. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u eritrocitima kontrolne grupe	54
4.3.5. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u eritrocitima pacijenata.....	56
4.3.6. Poređenje eritrocitnih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između kontrolne grupe i grupe pacijenata	58
4.3.7. Korelacije serumskih i eritrocitnih parametara oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata.....	60
4.3.8. Binarna logistička regresiona analiza postojanja veze između nivoa parametara oksidativno-stresnog statusa i sarkoidoze.....	62

4.3.9. Analiza Receiver Operating Characteristic (ROC) krivih za parametre serumskog i eritrocitnog oksidativno-stresnog statusa i lipidnog statusa	63
4.4. Raspodela LDL i HDL subfrakcija kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom	67
4.5. PON1 kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom	68
4.5.1. Optimizacija metode za određivanje PON1 aktivnosti.....	69
4.5.5. Fenotip aktivnosti PON1 za položaj 192 (Q/R).....	72
4.5.2. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u kontrolnoj grupi	74
4.5.3. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u grupi pacijenata.....	75
4.5.4. Poređenje POazne i DZOazne aktivnosti PON1 između kontrolne grupe i grupe pacijenata	77
4.5.6. Korelacije aktivnosti enzima PON1 sa parametrima inflamacije, oksidativno-stresnog statusa i lipidnog statusa u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata	79
4.5.7. Ispitivanje nezavisnog uticaja parametara inflamacije, lipidnog statusa i oksidativno-stresnog statusa na POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata	82
4.6. Parametri inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u akutnoj i hroničnoj sarkoidozi	83
4.6.1. Poređenje parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa između kontrolne grupe, pacijenata sa akutnom i pacijenata sa hroničnom sarkoidozom....	83
4.6.2. Korelacije parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u akutnoj i hroničnoj sarkoidozi	88
4.6.3. Ispitivanje nezavisnog uticaja LDL i HDL subfrakcija i oksidativno-stresnog statusa na tok sarkoidoze	92
4.7. Parametri inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u plućnoj i plućnoj sarkoidozi udruženojsa vanplućnim manifestacijama.....	94
4.7.1. Poređenje parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa između kontrolne grupe, pacijenata sa plućnom i pacijenata sa kombinovanom plućnom i vanplućnom sarkoidozom.....	94
4.7.2. Korelacije parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u izolovanoj plućnoj i plućnoj sarkoidozi sa vanplućnim manifestacijama	99
4.7.3. Ispitivanje nezavisnog uticaja oksidativno-stresnog statusa i doze leka na proporciju malih, gustih HDL subfrakcija u plućnoj sarkoidozi.....	103

5. DISKUSIJA	105
6. ZAKLJUČCI.....	117
7. LITERATURA	119
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	138
9. Prilog 1.- IZJAVA O AUTORSTVU.....	139
10. Prilog 2.- IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA.....	140
11. Prilog 3.- IZJAVA O KORIŠĆENJU.....	141

1. UVOD

1.1. Sarkoidoza – definicija, istorijat i etiologija

Sarkoidoza je multisistemska, inflamatorna bolest koja zahvata pluća, ali i druge organe i tkiva kao što su srce, nervni sistem, koža, oči, limfne žlezde, jetra, slezina, mišići, kosti (1, 2). U osnovi termin “sarkoidoza” potiče od grčke reči “sarco” što znači “mesnat” i “osis” što znači “stanje” i ovakav naziv se odnosio na kožne lezije koje se formiraju na različitim delovima tela (3, 4). Incidenca sarkoidoze je 11 na 100 000 kod ljudi bele rase odnosno 36 na 100 000 kod ljudi crne rase (3). Bolest se uglavnom javlja kod mladih i sredovečnih osoba u dobi od 20 do 40 godina pri čemu se najviše novoobolelih registruje u starosnoj dobi između 20 i 29 godina i nešto je češća kod ženske populacije. Bolest je prvi put opisana još 1877. godine i danas nastavlja da zaokuplja pažnju lekara kliničara i naučnika (2).

Iako etiologija sarkoidoze nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da genetska predispozicija organizma i specifični agensi iz spoljašnje sredine igraju značajnu ulogu u prekomernoj aktivaciji imunskog sistema koji se nalazi u osnovi oboljenja. Što se tiče genetske predispozicije, u jednoj studiji, rađenoj na ispitanicima u Italiji i Češkoj, utvrđena je pozitivna asocijacija određenih manifestacija sarkoidoze sa fenotipovima HLA-A1, -B8 i -DR3 dok je negativna asocijacija pronađena sa fenotipovima HLA-B12 i -DR4 (5). Sarkoidoza je takođe povezana sa određenim agensima čiji je prikaz dat u Tabeli 1 (2).

Tabela 1. Primeri agenasa za koje se veruje da su uključeni u etiologiju sarkoidoze (2)

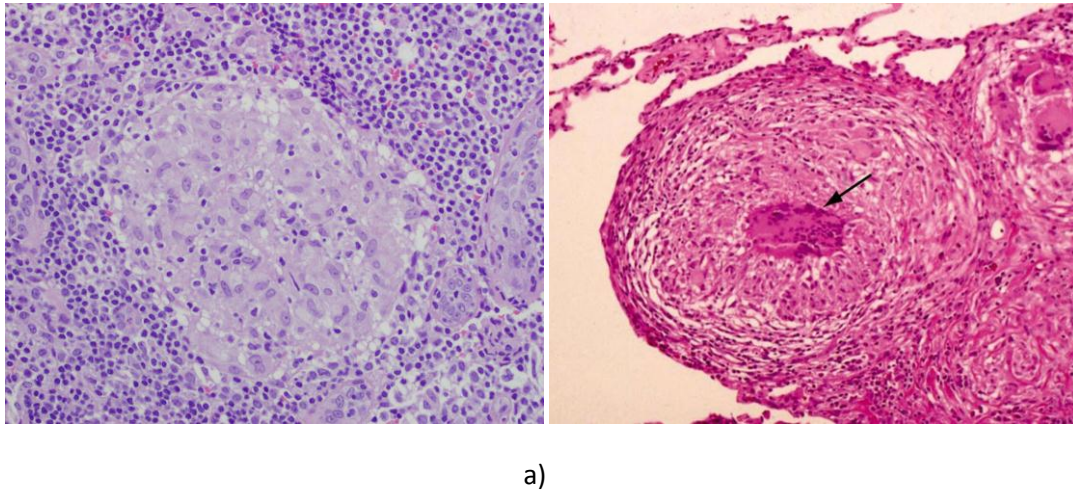
Tip agensa		
Infektivni	Neorganski	Organski
Virusi (herpes, EBV, retrovirusi, koksaki B virusi, CMV)	Aluminijum	Polen bora
Borrelia burgdorferi	Cirkonijum	Glina
Propionbacterium acnes	Talk	
Mycobacterium tuberculosis i druge mikobakterije		
Mycoplasma		

Među prethodno pomenutim činiocima, smatra se da najveći značaj imaju mikobakterije, tj. njihovi antigeni. Milman i saradnici (6), kao i Chapman i saradnici (7) detektovali su antitela na mikobakterije u serumu čak 50-80% pacijenata sa sarkoidozom, dok je prisustvo ovih antitela bilo registrovano u svega nekoliko zdravih ispitanika. Do sada, nije bilo moguće izolovati mikobakterije u kulturi, ali prema stavu nekih eksperata (2) to ipak ne isključuje značajnijevog prisustva u patogenezi bolesti. Neki od nalaza u tom smislu govore o prisustvu komponenata ćelijskog zida mikobakterija u sarkoidnim nodulima i to tuberkulostearinske kiseline (8) i muramil-dipeptida (9), zatim i mikobakterijske DNK ili ribozomalne RNK u ćelijama bronhoalveolarnog lavata pacijenata sa sarkoidozom (10, 11). Radovi Song-a i saradnika (12), kao i Chen-a i saradnika (13) idu u prilog tezi o mikobakterijskoj etiologiji bolesti s obzirom da su oni utvrdili postojanje mikobakterijskog antigena (katalaza-peroksidaza mKatG) u sarkoidnim granulomima. Smatra se da ovaj antigen dovodi do stimulacije imunskog odgovora i tako doprinosi inicijaciji oboljenja (13).

1.2. Imunski odgovor u sarkoidozi i formiranje granuloma

Bez obzira na uzročnika, imunološki odgovor započinje akumulacijom aktiviranih T pomoćničkih ("helper") limfocita, prevashodno CD4+ fenotipa, kao i makrofaga na mestima inflamacije (2, 14, 15). T limfociti i makrofage produkuju veliki broj različitih proinflamatornih citokina kao što su interleukin 2 (IL-2), IL-12, IL-15, faktor nekroze tumora α (TNF α), interferon γ , faktore rasta (2, 13). Smatra se da IL-2 deluje kao lokalni faktor rasta za T limfocite i naročito doprinosi njihovoj infiltraciji u ciljnom tkivu (16, 17). Usled kompleksnih interakcija T limfocita i makrofaga, uz predominaciju aktiviranih CD45RO+ Th1 limfocita, formira se sarkoidni granulom.

Sarkoidni granulomi mogu da se nalaze u različitim tkivima i organima zahvaćenim bolešću pri čemu su slične strukture bez obzira na lokalizaciju (18, 19). Granulomi predstavljaju kompaktne tvorevine sastavljene od visoko-diferentovanih mononuklearnih fagocita (epiteloidnih ćelija i džinovskih ćelija) i limfocita. Epiteloidne ćelije podsećaju na epitelne ćelije i otuda njihov naziv. Džinovske Langhansove ćelije nastaju fuzijom više pojedinačnih makrofaga. Centralni deo granuloma sačinjavaju CD4+ T limfociti dok se CD8+ limfociti nalaze u perifernoj zoni granuloma (20, 21). Neki primeri granuloma prikazani su na Slici 1 (22, 23).



Slika 1. Primeri nekazeifikovanih granuloma u tkivima pacijenata sa sarkoidozom

- a) Nekazeifikovani granulom u limfnom čvoru pacijenta obolelog od sarkoidoze (22)
- b) Dobro uobličen nekazeifikovani granulom u plućnom tkivu (granulom se sastoji od jezgra epitelioidnih makrofaga dok se na periferiji nalaze limfociti). Strelicom je prikazana džinovska multinuklearna ćelija u jezgru (23)

Za sarkoidne granulome je karakteristično da mogu da se spontano povuku ili mogu da dovedu do fibroznih promena u zahvaćenom tkivu/organu (2). Pored prethodno pomenutih inflamatornih parametara, u makrofagama granuloma produkuj se različiti i enzimi kao što su kolagenaze, elastaze, aktivator plazminogena, angiotenzin-konvertujući enzim (ACE), fosfataze, sulfataze, esteraze (24), kao i 25-hidroksivitamin D 1 α -hidroksilaza (25) i drugi produkti (24).

1.3. Klinički tok sarkoidoze

Sarkoidoza je oboljenje nepredvidivog toka i može se posmatrati kao akutna ili kao hronična. Akutni tok bolesti sa nodoznim eritemom ili asimptomatskom bilateralnom hilarnom limfadenopatijom ima često ograničeni tok, dok hronična bolest obično podrazumeva multiple ekstrapulmonarne lezije, sa perzistentnim simptomima, dužim od dve godine, sa kliničkim, radiografskim i biohemijskim parametrima aktivnosti koji pokazuju prolongiranu granulomsku aktivnost i mogu biti praćeni progresijom oboljenja (2, 26).

Akutne kožne promene tipa nodoznog eritema se karakterišu uvećanim, crvenim, mekim ispupčenjima ili nodulima na podkolenicama i podlakticama. Lofgrenov sindrom, kao tip

akutne sarkoidoze, uključuje groznicu, bilateralnu hilarnu limfadenopatiju, nodozni eritem i artralgiu (27). Spontane remisije su česte kod akutne sarkoidoze (2).

Jedan od oblika hronične sarkoidoze koji je lokalizovan na koži je lupus pernio, a sa njim su često udružene i ciste na kostima i plućna fibroza. Spontane remisije su retke. Drugi primer hroničnog toka sarkoidoze je hronični uveitis koji može da dovede do adhezije irisa i očnog sočiva kada se javljaju glaukom, katarakta i slepilo (2). Kao simptomi hronične sarkoidoze još se navode dugotrajni suv kašalj, dispnea, osećaj stezanja u grudima, zamor, povišena temperatura, bolovi u mišićima, kostima i zglobovima, uvećane periferne limfne žlezde (26).

1.4. Kliničke manifestacije sarkoidoze

Kao što je prethodno rečeno, sarkoidoza najčešće pogađa plućno tkivo pri čemu su sledeći nalazi značajni za postavljanje dijagnoze: prisustvo karakterističnog epitelooidnog granuloma bez kazeozne nekroze uz eliminaciju svih ostalih mogućih uzroka nastanka granuloma (gljivice, parazitarne infekcije, mikobakterioze), kao i "sarcoid-like" reakcije. Među tkivima/organima koji mogu biti zahvaćeni bolešću su srce, oči, nervni sistem, mišići, kosti, gastrointestinalni trakt, parotidne žlezde, reproduktivni organi, bubrezi (2). Nespecifični simptomi kao što su groznica, zamor, slabost, gubitak telesne mase se javljaju kod oko trećine pacijenata bez obzira na lokalizaciju bolesti. Temperatura je uglavnom blago povišena, ali zamor, ako je prisutan, može prilično da utiče na kvalitet života obolelog (2).

Smatra se da vanplućna manifestacija koja uglavnom uključuje i plućno tkivo predstavlja teži oblik od isključivo plućne manifestacije. Vanplućno lokalizovano oboljenje se karakteriše i većim brojem sarkoidnih granuloma, pa stoga i većim stepenom inflamacije (28), dispnejom, generalno težim simptomima i ugroženijim zdravstvenim statusom (29).

1.5. Inflamatorni markeri u sarkoidozi

Među navedenim parametrima, određivanje serumskog ACE se izdvojilo kao značajno u kliničkoj dijagnozi granulomatoznih oboljenja (24, 30). ACE je glikoproteinski enzim koji se produkuje u monocitima, makrofagama i plućnim endotelnim ćelijama, a kod pacijenata sa sarkoidozom i epitelooidne i džinovske ćelije u sarkoidnim granulomima učestvuju u sintezi ovog enzima. Enzim se zatim sekretuje u cirkulaciju. Smatra se da čak 60% pacijenata sa sarkoidozom

ima povišene vrednosti ovog parametra (25). Ipak, novije studije govore o nedostacima ACE kao biomarkera sarkoidoze, pa tako prilikom određivanja ovog markera kod 1941 pacijenta sa sarkoidozom, 1575 zdravih osoba i 1355 pacijenata sa drugim bolestima, utvrđeno je da je dijagnostička osetljivost za sarkoidozu bila 57%, specifičnost 90%, pozitivna prediktivna vrednost 90% i negativna prediktivna vrednost samo 60% (31). Mogući polimorfizmi u genima za ACE i angiotenzin II receptoratakođe mogu da utiču na aktivnost ACE (25).

Pod uticajem prethodno pomenutih proinflamatornih citokina, dolazi do povećane sinteze proteina akutne faze u jetri među kojima je i C-reaktivni protein (CRP). Iako se smatra dobrim prognostičkim parametrom kardiovaskularnih događaja (32), određene studije koje su se bavile njegovim značajem u sarkoidozi, nisu dokazale da on može da posluži kao koristan marker za procenu aktivnosti bolesti (33).

1.5.1. Uloga serumskog amiloida A (SAA) u sarkoidozi

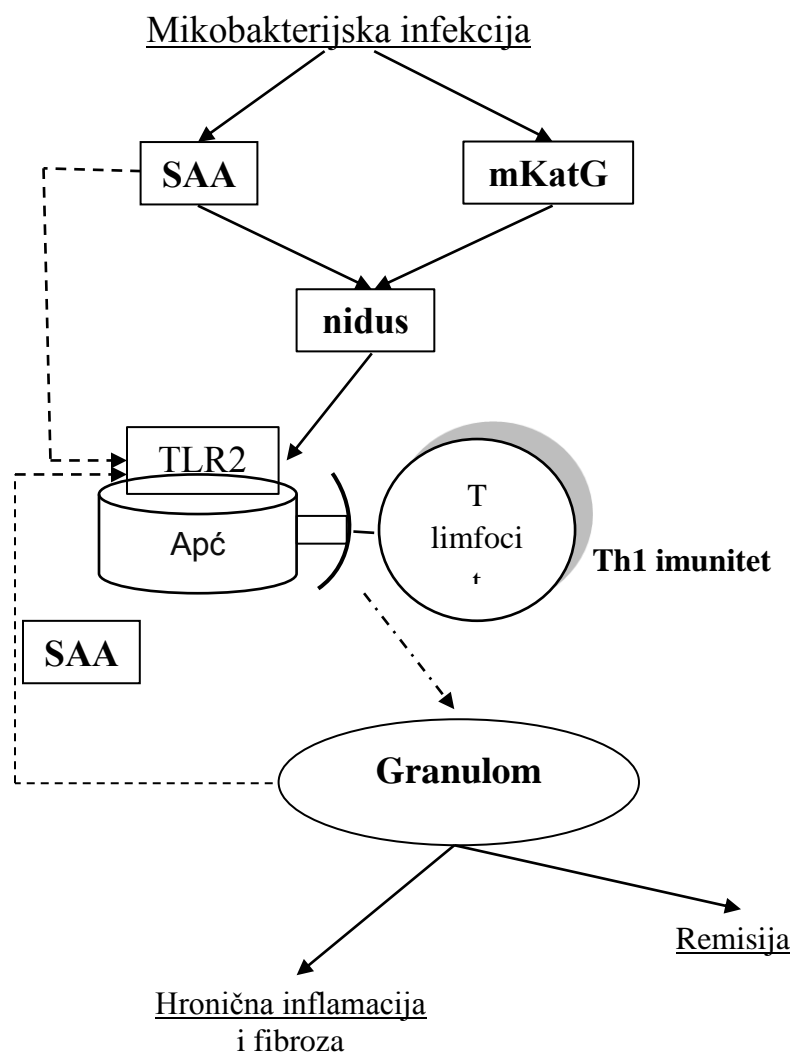
Serumski amiloid A (SAA) pripada porodici apolipoproteina čija ekspresija može biti konstitutivna (cSAA) ili se odigrava u akutnoj fazi (aSAA). SAA kao reaktant akutne faze ima daleko veći značaj od konstitutivne forme i njegova koncentracija može biti čak i do 1000 puta veća u inflamatornim reakcijama (34). Sinteza SAA se povećava u jetri i oslobađa se zajedno sa CRP-om pod uticajem IL-1 i IL-6 (25, 34), ali i u drugim ekstrahepatičnim tkivima (34). Noviji radovi naglašavaju značaj SAA kao važnog markera granulomatozne inflamacije (13, 35) jer, osim što predstavlja deo granuloma, on reguliše njegovo formiranje, ali utiče i na produkciju citokina (13). Utvrđeno je da se intenzitet ekspresije i distribucija SAA u sarkoidozi razlikuju u odnosu na sve druge granulomatozne bolesti. SAA je lokalizovan u makrofagama i džinovskim ćelijama, ali je povezan i sa Th limfocitima. Neke od značajnih, novootkrivenih funkcija SAA su sledeće: delujući na Toll-like 2 receptore na ciljnim ćelijama, dovodi do povećane sinteze NF- κ B; reguliše granulomatoznu inflamaciju posredovanu Th1 limfocitima preko IFN γ , TNF α , IL-10 i Toll-like 2 receptora; stimuliše produkciju TNF α , IL-10 i IL-18 (ovaj efekat SAA može da se suprimira ako se blokiraju Toll-like 2 receptori) (13). Rad Bargagli-ja i saradnika (36) takođe ukazuje na povećanu koncentraciju SAA kod pacijenata sa sarkoidozom u odnosu na kontrolnu grupu, kao i na porast koncentracije ovog markera u slučaju teže forme bolesti koja je praćena pogoršanjem radioloških i funkcionalnih parametara organa zahvaćenih sarkoidnim granulomima, a ponajviše pluća.

SAA akutne faze se najpre sintetise kao protein koji sadrži 122 aminokiseline. Odvajanjem signalnog peptida od 18 aminokiselina, dobija se funkcionalni protein koji ima 104 aminokiseline. U sekundarnoj strukturi proteina dominiraju 2 regiona α -heliksa uz dodatak segmenata β -ploča (34) (Slika 2).



Slika 2. Struktura molekula SAA (37)

Na Slici 3 predstavljena je uloga koju SAA ima u sarkoidnom granulomu gde predstavlja vezu između mikobakterijske infekcije i hronične granulomatozne inflamacije (13). Veruje se da u sarkoidozi antigen-prezentujuće ćelije koje nose mikobakterijske antigene dovode do lokalne indukcije SAA koji se zatim povećava i usled sistemskog akutno-faznog odgovora. Formirani mehanizam je efikasan u uklanjanju mikobakterija pri čemu se zadržavaju samo njihovi proteinski antigeni kao što je mKatG. SAA služi kao jezgro oko koga se gomilaju drugi amiloidima-slični proteini koji zatim vezuju ostale matriksne proteine da bi se formirao “nidus” epiteloideg granuloma. U ovom slučaju, SAA i drugi matriksni proteini zadržavaju mikrobne ili autoantigene u okviru granuloma dok solubilni SAA, oslobođen iz ovih tkivnih granuloma, služi kao ligand za Toll-like 2 i druge receptore i na taj način reguliše Th1 granulomatoznu inflamaciju. Inflamacija dalje može da se povuče nakon uklanjanja SAA i lokalnog patogenog antigena. Ako se SAA i antigeni ne uklone adekvatno putem Th1 imunskog odgovora mogu se javiti hronična inflamacija i fibroza (13).



Slika 3. SAA u sarkoidozi – veza između mikobakterijske infekcije i hronične granulomatozne inflamacije

1.6. Oksidativni stres u sarkoidozi

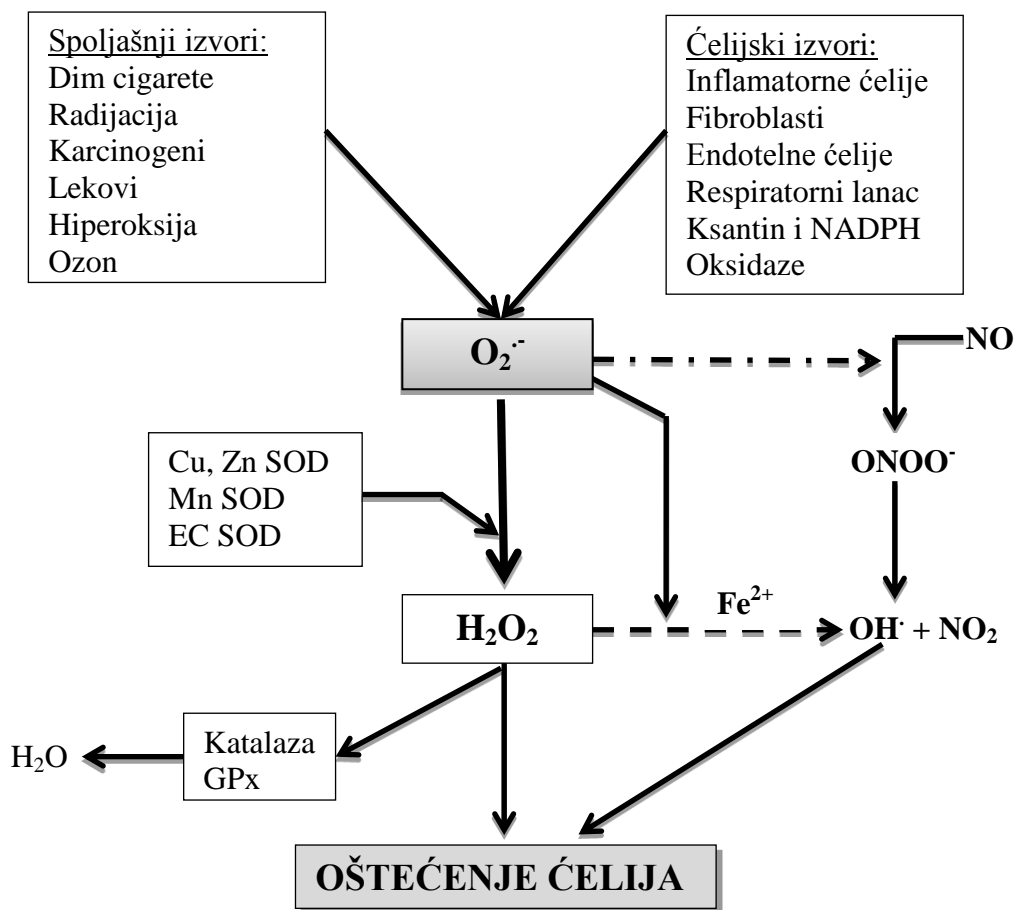
Oksidativni stres nastaje kada antioksidativni mehanizmi u organizmu nisu sposobni da neutrališu višak slobodnih radikala koji se javljaju usled poremećaja ravnoteže oksidoredukcionih procesa. Slobodni radikal može biti bilo koji atom, atomska grupa ili molekul koji sadrži jedan ili više nesparenih elektrona (38). U organizmu mogu da se generišu različiti oksidansi pri čemu njihovi okidači mogu biti egzogenog ili endogenog porekla. Okidači egzogenog porekla mogu biti dim cigareta, radijacija, karcinogeni, dok su endogeni izvori

respiracija u mitohondrijama, inflamatorne ćelije, ksantin-oksidaza i NADPH oksidaze. Pomenuti okidači najčešće dovode do produkcije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) koji može normalno da se ukloni mehanizmima antioksidativne zaštite tj. pomoću enzima superoksid-dizmutaze (SOD) (38, 39) uz stvaranje vodonik-peroksida (H_2O_2). Nastali H_2O_2 može da se prevede u O_2 i H_2O pomoću glutation-peroksidaze (GP_x) u mitohondrijama ili pomoću katalaze (CAT) u citosolu. Ipak, H_2O_2 u prisustvu jona prelaznih metala može da stvori i reaktivne slobodne radikale (HO^{\cdot} , HO_2^{\cdot}) i ova reakcija je poznata kao „Fentonova reakcija“. Pomenuti oksidansi mogu da dovedu do oštećenja različitih biomolekula, među kojima su lipidi, proteini, ugljeni hidrati (38). Dejstvom oksidanasa na lipidne molekule najpre se generišu lipidni hidroperoksidi (40) dok u krajnjem stadijumu lipidne peroksidacije nastaje malondialdehid (MDA) (41, 42). Pored MDA, koji se već duže vreme koristi kao marker oksidativnog oštećenja lipida, danas se značaj daje i novim parametrima kao što je totalni oksidantni status (TOS) čije su glavne komponente lipidni hidroperoksidi i H_2O_2 (43). Merenjem više različitih činilaca oksidativnog stresa, moguće je dobiti precizniji uvid u stanje oksidativnog stresa prisutnog u organizmu.

Kao značajni izvori činilaca oksidativnog stresa navode se aktivirane ćelije imunskog sistema u inflamatornim stanjima (38, 44). Pored toga što proinflamatorni citokini deluju kao hemoatraktanti za polimorfonuklearne ćelije, a koje proizvode slobodne radikale, oni mogu da indukuju i ekspresiju nekih antioksidantnih molekula kao što je Mn-SOD (45).

Različiti antioksidansi su sposobni da neutrališu štetne efekte oksidanasa i mogu se podeliti na neenzimske i enzimске. U neenzimske antioksidanse ubrajaju se proteini (tj. njihove sulfhidrilne (SH) grupe), glutation (GSH), mokraćna kiselina, vitamin C, α -tokoferol, β -karoten. Enzimski antioksidansi su već pomenuti SOD, GP_x , CAT, zatim i hem-oksigenaza, tioredoksini, peroksiredoksini (38, 46). Kao i za parametre oksidativnog stresa, razvijena je nova metoda kojom je moguće odrediti više različitih antioksidanasa. Ovom metodom se meri totalni antioksidantni status (TAS) u čiji sastav ulaze primarno proteinske SH grupe i mokraćna kiselina, dok znatno manji udeo pripada vitaminu C, ukupnom bilirubinu, vitaminu E i drugim antioksidansima (47). Treba pomenuti još jedan parametar koji se koristi poslednjih godina, a to je prooksidantno-antioksidantni balans (PAB) kojim se može simultano meriti opterećenost prooksidansima i kapacitet antioksidanasa tj. postojeća ravnoteža između njih (48, 49).

Šematski prikaz oksidanasa koji dovode do oštećenja ćelije i njihovih izvora, kao i antioksidanasa prikazan je na Slici 4 (38).



Slika 4. Reaktivne kiseonične vrste (ROS) i neke od komponenata antioksidativnog sistema zaštite u ćeliji (38)

Kako je sarkoidoza inflamatorno oboljenje, nekoliko studija se bavilo oksidativnim stresom kod ovih pacijenata. Tako su Boots i saradnici (50) utvrdili smanjenje antioksidativne zaštite kroz smanjenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta plazme, smanjene nivoa vitamina C, mokraćne kiseline i GSH uz istovremeno povećanje bazalnog TNF α i IL-8 kao inflamatornih markera. Studija Koutsokera i saradnika (40) ukazala je na viši nivo ukupnih serumskih hidroperoksida kod pacijenata sa plućnom sarkoidozom u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, pacijenti koji su primali kortikosteroide su imali nižu koncentraciju ovih hidroperoksida u

poređenju sa onima koji nisu primali ovu terapiju. Pacijenti sa sarkoidozom imaju i povećan nivo 8-izoprostana u izdahnutom vazduhu (51). U radu Lakari i saradnika (52) dokumentovana je povećana aktivnost enzima MnSOD u granulomima pacijenata sa plućnom sarkoidozom pri čemu se ovaj porast antioksidativne zaštite pripisuje delovanju citokina koji učestvuju u formiranju granuloma. Utvrđeno je da čak alveolarne makrofage izolovane iz tkiva pacijenata sa sarkoidozom proizvode *in vitro* značajne količine O_2^- (53).

Posebnu ulogu u razvoju bolesti bi mogli da imaju eritrociti jer oni mogu da neutrališu slobodne radikale, a naročito O_2^- i H_2O_2 koji se tokom povećanog oksidativnog stresa generišu u plućnoj mikrocirkulaciji i oštećuju funkcionalno plućno tkivo (53, 54). Ipak, samo studija Rothkrantz-Kos i saradnika (55) opisuje smanjenje nivoa NADPH (kofaktora neophodnog za prevođenje glutationa u njegov redukovani oblik) u eritrocitima pacijenata sa plućnom sarkoidozom. Svi ovi rezultati idu u prilog postojanju disbalansa u oksidativno-stresnom statusu kod pacijenata sa sarkoidozom, ali generalno, ne pružaju detaljniji uvid u oksidativno-stresni status u krvi (serumu i eritrocitima) ovih pacijenata.

1.7. Promene lipidnog statusa u sarkoidozi

Inflamatorni procesi u sarkoidozi mogu da dovedu i do promena u metabolizmu lipoproteinskih čestica bogatih trigliceridima (56) ili da smanje kapacitet lipoproteinskih čestica visoke gustine (HDL) u efluksu holesterola (57) što se manifestuje promenama u lipidnom statusu. Smanjenje koncentracija ukupnog holesterola (UH) i HDL-holesterola (HDL-H) (58) ili značajno smanjenje samo HDL-H (59) je utvrđeno kod pacijenata sa sarkoidozom. Imajući u vidu da se u terapiji sarkoidoze primenjuju i kortikosteroidi, istraživanja su pokazala da kod pacijenata tretiranih prosečnom dozom od 20 mg prednizolona tokom 6 meseci (što se smatra kratkotrajnom primenom niske doze leka) dolazi do porasta koncentracije HDL-H (60) iako je poznato da dugotrajna primena kortikosteroida može da izazove dislipidemiju (61).

Takođe, dislipidemija i oksidativni stres su već poznati i dobro proučeni faktori za razvoj ateroskleroze (62), ali još uvek nije dovoljno ispitana veza pomenutih faktora sa rizikom za nastanak kardiovaskularnih bolesti (KVB) kod pacijenata sa sarkoidozom. Do sada publikovane studije govore o povezanosti hroničnih inflamatornih bolesti i povećanog rizika za KVB. Kizer i saradnici (63) su ukazali na moguću vezu između plućnih bolesti koje uključuju

fibrozu i povećane verovatnoće za nastanak KVB, dok studija Ardic-a i saradnika (64) direktno upućuje na smanjenje elastičnosti zida aorte kod pacijenata sa sarkoidozom.

1.7.1. LDL i HDL subfrakcije

Lipoproteini plazme čine kompleksnu mešavinu subfrakcija različite veličine, gustine i sadržaja lipida (65). Lipoproteini niske gustine (LDL) se pretežno sastoje od esterifikovanog holesterola i TG koji su zastupljeni u jezgru čestica i od slobodnog holesterola i fosfolipida koji se nalaze u lipidnom omotaču (66). Koristeći gradijent-gel elektroforezu moguće je razdvojiti i do 7 subfrakcija, koje se najčešće grupišu u 4 klase od LDL I do LDL IV (67). LDL I subfrakcije imaju najveći dijametar i najmanju gustinu, a LDL IV su najmanje i najgušće. Male, guste LDL čestice mogu da nastanu usled prekomerne sinteze VLDL čestica (68), smanjene aktivnosti lipoproteinske lipaze (LPL) i povećane aktivnosti hepatične lipaze (69), remodelovanja pod uticajem holesterol-estar transfernog proteina (CETP) (70) i direktnom produkcijom u jetri (71). Značajno je pomenuti da u prisustvu CETP-a dolazi do procesa razmene TG lipoproteina koji sadrže apoB sa estima holesterola koje nose HDL čestice. To je prilično izraženo u hipertrigliceridemiji kada LDL čestice postaju male i guste. Predložena su dva mehanizma koji dovode do nastanka gustih LDL: jedan podrazumeva indirektni mehanizam kojim se vrši transfer estara holesterola sa HDL-a na velike prekursore VLDL₁, a drugi je direktni mehanizam u kome se estri holesterola sa HDL-a prenose na male, guste LDL čestice (70). Ovakve čestice lakše prodiru kroz endotel i više se nakupljaju u subendotelnom prostoru krvnih sudova (72).

U stanjima inflamacije i povećanog oksidativnog stresa, LDL čestice, predominantno male guste, podležu oksidativnim modifikacijama (73, 74) jer sa jedne strane, prisutno je više oksidansa, a sa druge strane, smanjen je antioksidativni potencijal HDL čestica (75, 76). Smatra se da oksidacija LDL-a započinje fazom u kojoj se prvo troše endogeni antioksidansi, zatim sledi faza kada se nezasićene masne kiseline oksiduju do lipidnih hidroperoksida da bi u poslednjem stupnju došlo do razlaganja peroksidnih jedinjenja do reaktivnih aldehida među kojima je i MDA i 4-hidroksinonenal. Interakcija ovih aldehida sa pozitivno naelektrisanim ϵ -amino grupama lizinskih rezidua proteina LDL čestica povećava stepen njihovog negativnog naelektrisanja pri čemu se smanjuje njihov afinitet za LDL receptore, a povećava za scavenger receptore (77). Oksidativno modifikovane LDL čestice mogu dalje da indukuju inflamatorno stanje delujući kao aktivatori za određene proteine kao što su monocit-hemoatraktant protein 1 (MCP1), faktor stimulacije kolonija makrofaga (M-CSF), IL-8, P-selektin i druge (77, 78) i tako dodatno da

pogoršaju već postojeću inflamaciju. Zbog svega navedenog, ovakve čestice povećavaju rizik za nastanak KVB (77).

HDL su najmanje i najgušće lipoproteinske čestice, a elektroforeza na poliakrilamidnom gradijentu gelu omogućila je razdvajanje HDL čestica u nekoliko subfrakcija (od najvećih do najmanjih): HDL 2b, HDL 2a, HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c (79). U početnoj fazi reverznog transporta holesterola, male, nascentne HDL čestice preuzimaju holesterol iz perifernih tkiva (80). Sazrevanje i remodelovanje HDL-a se dalje dešava u cirkulaciji pod dejstvom enzima lecitin holesterol acil-transferaze (LCAT) kada najpre iz nascentne, diskoidne forme HDL-a nastaju HDL 3 (81), a zatim i sferne HDL 2 čestice (82). U toku sazrevanja u HDL 2 subfrakcije, odvija se i već prethodno pomenuti proces razmene estara holesterola sa TG lipoproteina koji sadrže apoB u prisustvu CETP-a i to je prilično izraženo u hipertrigliceridemiji. Na ovaj način, i HDL čestice, poput LDL čestica, ostaju male i guste i tako se smanjuju njihove ateroprotektivne osobine (83). Oksidativni stres takođe dovodi i do urušavanja funkcionalnih karakteristika HDL čestica kada dolazi do smanjenja kapaciteta u efluksu holesterola i gubljenja njihovih anti-inflamatornih i antioksidativnih osobina (75).

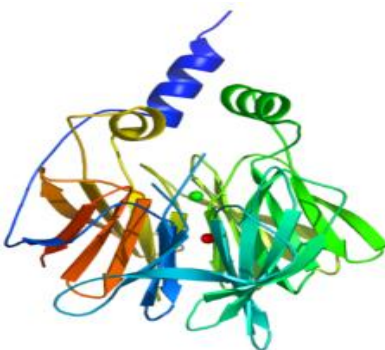
Do sad je publikovana jedna studija koja govori o promenama u distribuciji HDL subfrakcija u sarkoidozi, koja pokazuje da je smanjen sadržaj holesterola u većim HDL2 subfrakcijama i povećan udeo manjih HDL3 čestica (59), dok za promene u distribuciji LDL čestica još uvek nema podataka. Pretpostavlja se da inflamacija i oksidativni stres prisutni u sarkoidozi, doprinose promenama u veličini, strukturi i distribuciji pojedinih subfrakcija HDL-a i LDL-a pri čemu se favorizuje nastanak malih LDL i HDL čestica (56). Vezi između inflamatornih činilaca i metabolizma LDL i HDL subfrakcija ide u prilog i saznanje da postoji preklapanje u genskim lokusima za proteine koji regulišu sintezu lipida i funkcije imunskog sistema u različitim bolestima, a među kojima je i sarkoidoza (84). Pomenute promene mogu svakako da doprinesu nastanku i progresiji ateroskleroze kod pacijenata sa sarkoidozom s obzirom na to da je utvrđena veza između malih LDL i HDL subfrakcija i ateroskleroze (85).

1.8. Paraoksonaza 1 (PON1)

Enzim paraoksonaza 1 (PON1) je dobio ime po svojoj sposobnosti da hidrolizuje paraokson, organofosfatno jedinjenje koje je toksični metabolit insekticida parationa. Pored paraoksone, i druga organofosfatna jedinjenja kao što su diazokson, hlörpirifos okson; nervni

bojni otrovi: soman i sarin su supstrati ovog enzima (86). Utvrđeno je da PON1 ima i arilesteraznu aktivnost (supstrat je neki aromatični estar npr. fenil-acetat). Istraživanja iz 90-ih godina prošlog veka su ukazala da ovaj enzim poseduje i sposobnost razgradnje lipidnih hidroperoksida u LDL česticama (87), pa se smatra da je najznačajnija uloga PON1 u organizmu upravo razlaganje lipidnih medijatora koji nastaju u procesu oksidacije polinezasićenih masnih kiselina (88).

PON1 se sintetise u jetri i sekretuje u cirkulaciju gde se vezuje za HDL čestice (86). Enzim se sastoji od 354 aminokiseline i ima relativnu molekulsku masu od 43.000 (89). Za stabilizaciju strukture enzima i katalitičku aktivnost neophodna su dva atoma kalcijuma koji se nalaze u centralnoj šupljini tako da je enzim kalcijum-zavisna esteraza. Definisanjem kristalne strukture PON1 (Slika 5), utvrđeno je da se enzim putem tri α -heliksa vezuje za HDL česticu, a aktivni centar je takođe orijentisan prema površini HDL čestice (86).



Slika 5. Kristalna struktura PON1 proteina (90)

1.8.1. Polimorfizam enzima PON1

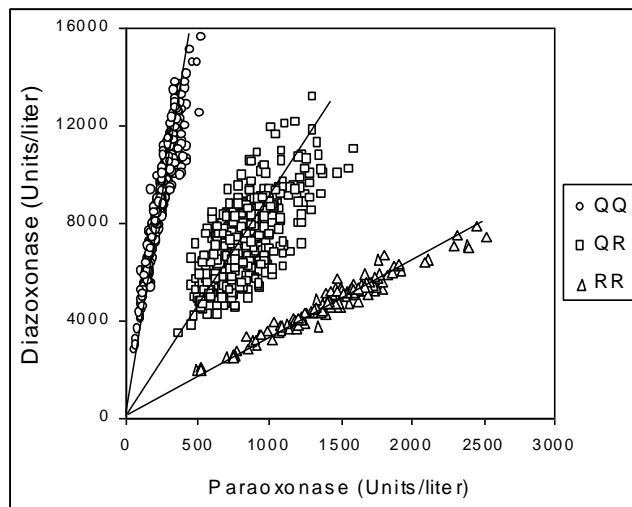
PON1 enzim se odlikuje značajnim polimorfizmom u kodirajućem i nekodirajućem regionu pri čemu je do danas otkriveno čak oko 200 polimorfnihih mesta u sekvenci PON1 gena (91).

Polimorfizmi u nekodirajućem regionu se prisutni u promotorskom delu PON1 gena i to na sledećim pozicijama: -108(C/T), -126 (G/C), -162 (A/G), -832 (G/A) i -909 (C/G) (92). Među navedenim polimorfizmima, najznačajniji je onaj na poziciji -108 za koji je dokazano da

učestvuje sa 22,4% varijacije ekspresije PON1, a -108C forma se karakteriše višim nivoima PON1 u plazmi (93).

U kodirajućem regionu otkrivena su dva polimorfizma: supstitucija metionina (M) leucinom (L) na poziciji 55 i supstitucija glutamina (Q) argininom (R) na poziciji 192 (94, 95). Humbert i saradnici (95) su definisali PCR metodu kojom je potvrđeno postojanje polimorfizma na pozicijama 55 i 192 kod brojnih populacija. Polimorfizam na poziciji 192 je najviše proučavan, pa je za populaciju belaca u SAD zabeležena frekvenca gena za PON1_{Q192} oko 0,75, a za azijsku populaciju ta frekvenca iznosi oko 0,3 (92).

Katalitička aktivnost prema različitim nefiziološkim supstratima se razlikuje u zavisnosti od genotipa enzima. Proučavajući polimorfizam na poziciji 55, dokazano je da osobe sa PON1_{M55} genotipom imaju niže aktivnosti PON1 u plazmi (96), ali je utvrđeno i da ovaj polimorfizam ne pokazuje specifičnu aktivnost ni prema jednom od ispitivanih supstrata (95). Za razliku od polimorfizma na poziciji 55, polimorfizam na položaju 192 je pokazao značajne supstrat-specifične razlike. Tako, R varijanta ima jače izražen afinitet prema paraoksonu dok Q varijanta ima veći afinitet prema diazoksonu (97, 98). Određivanjem aktivnosti enzima prema diazoksonu i paraoksonu, a zatim računanjem odnosa diazoksonazna/paraoksonazna aktivnost (status enzima PON1) može da se odredi fenotip enzima (Slika 6). Rezultati nekih studija pokazuju da fenotip može biti bolji pokazatelj patofizioloških stanja od genotipa (99, 100). Ovakvim pristupom se otkrivaju aleli kod heterozigota koji mogu biti inaktivirani nekom mutacijom (93).



Slika 6. Razdvajanje fenotipova PON₁₁₉₂ prilikom određivanja aktivnosti enzima prema diazoksonu i paraoksonu. Populacija je jasno podeljena na 3 odvojena fenotipa QQ, QR i RR

1.8.2. Povezanost HDL čestica, SAA i PON1

Kao što je već prethodno pomenuto, HDL čestice učestvuju u procesu reverznog transporta holesterola tako što od nascentne, diskoidne forme sazrevaju i remodeluju se u veće, zrele čestice koje prenose holesterol iz perifernih tkiva u jetru (80, 81). Proučavanjem HDL čestica, došlo se do saznanja da one mogu imati anti-inflamatornu, antioksidativnu, antiaterogenu ulogu zahvaljujući različitim enzimima i apolipoproteinima koji su prisutni na površini čestice. Neki od tih enzima/proteina su PON1, GPx, acetilhidrolaza faktora agregacije trombocita (PAF-AH), LCAT, apoA-I i A-II (75, 101, 102). Apolipoproteini HDL-a nisu čvrsto vezani i mogu se lako menjivati sa drugim apolipoproteinima ili serumskim proteinima u toku metaboličkih procesa ili različitih patoloških stanja. Ovakve izmene mogu da utiču na HDL čestice – njihovu koncentraciju u plazmi, sastav, oblik, veličinu i funkcionalnost (101).

Među navedenim proteinima HDL čestica, naročit značaj je dat enzimu PON1 jer se smatra da on ima ključnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti pošto ima sposobnost razgradnje biološki oksidovanih lipida. Dokazano je da PON1 može da inhibira oksidaciju LDL čestica *in vitro* (87) kao i da inaktivira već stvorene oksidovane fosfolipide (103, 104) i da smanji osetljivost HDL čestice na procese glikozilacije i adicije homocisteina (105). PON1 inhibira biosintezu holesterola u makrofagama i stimuliše njegov efluks iz ovih ćelija (91, 106).

Amfifilna priroda HDL čestica je značajna u sekreciji, stabilizaciji i aktivnosti PON1. Enzim se vezuje pomoću svog hidrofobnog, N-terminalnog dela za fosfolipide HDL, a to doprinosi i njegovoj interakciji sa supstratima i ispoljavanju antioksidantne aktivnosti (107). Takođe, utvrđena je neophodnost apo-AI za stabilizaciju PON1, a da gubitak apo-AI ima za posledicu oslabljeno vezivanje PON1 za HDL i smanjenu enzimsku aktivnost (108).

Kako proteini HDL-a nisu čvrsto vezani za ovu česticu, u inflamatornim stanjima, moguć je njihov gubitak kada se smanjuje funkcionalnost HDL čestica i ubrzava njihov katabolizam. Predložena su dva mehanizma kojima se koncentracija HDL-a smanjuje u inflamaciji: jedan podrazumeva istovremeni porast sinteze SAA i smanjenje sinteze apo-AI i PON1 pod uticajem proinflamatornih citokina (109), a drugi direktnu zamenu apo-AI i PON1 na HDL-u amiloidnim proteinom (110). HDL čestice asocirane sa SAA bivaju dalje lako prepoznate od strane makrofaga u kojima podležu procesima endocitoze i razlaganja (111). Smatra se i da SAA inhibitorno deluje na enzim LCAT, uključenog u esterifikaciju holesterola u HDL česticama, pri čemu je onemogućeno normalno sazrevanje ovih čestica (59, 112). Do sada je u samo jednoj studiji praćen PON1 u sarkoidozi i utvrđeno je sniženje enzimске aktivnosti, ali bez uvida u fenotip enzima (113). Takođe, nema podataka o uticaju inflamacije izražene preko SAA, dislipidemije i oksidativnog stresa na PON1 kod pacijenata sa sarkoidozom.

Značajno je pomenuti i da razlike u svim gore navedenim parametrima između određenih tokova (akutna/hronična) i manifestacija (plućna/vanplućna) bolesti nisu dovoljno utvrđene. Pacijenti sa različitim tokovima i manifestacijama oboljenja mogu biti različito tretirani u zavisnosti od težine same bolesti, pa zato i terapija može da pokaže različit uticaj na vrednosti određenih parametara.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Inflamacija, oksidativno-stresni status i lipidni status, kao i njihova međusobna povezanost i klinički značaj nisu do sada proučavani kod pacijenata sa sarkoidozom u populaciji Srbije. Na osnovu toga, formulisani su sledeći ciljevi istraživanja:

- Ispitati inflamatorni, oksidativno-stresni status (u serumu i eritrocitima), lipidni status i raspodelu LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa sarkoidozom u odnosu na kontrolnu grupu
- Optimizovati metodu za određivanje aktivnosti enzima PON1, odrediti aktivnost i fenotip enzima u grupi pacijenata i u kontrolnoj grupi kao i razlike u aktivnostima enzima u okviru određenog fenotipa između pacijenata i kontrolne grupe
- Ispitati da li se parametri inflamacije, oksidativnog stresa, lipidnog statusa, raspodele LDL i HDL subfrakcija, PON1 statusa razlikuju u zavisnosti od toka i manifestacije bolesti (pri čemu se uzima u obzir prisustvo odnosno odsustvo vanplućne manifestacije kod koje je zahvaćeno i plućno tkivo)
- Analizirati međusobnu povezanost prethodno navedenih parametara u grupi pacijenata sa sarkoidozom i grupi zdravih ispitanika, kao i kod pacijenata sa različitim tokovima manifestacijama bolesti
- Proceniti mogućnost da su parametri inflamacije i oksidativno-stresnog statusa nezavisno povezani sa aktivnošću PON1 i zastupljenošću malih HDL čestica, kao i da li su distribucija LDL i HDL subfrakcija i oksidativno-stresni status nezavisno povezani sakliničkim tokom oboljenja
- Proveriti dijagnostičku tačnost parametara lipidnog i oksidativno-stresnog statusa kao prediktora postojanja bolesti

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U ispitivanju je učestvovalo 213 pacijenata sa dijagnozom sarkoidoze (138 žena i 75 muškaraca) prosečne starosti $51,6 \pm 10,8$ godina. Dijagnoza sarkoidoze je postavljena na osnovu preporuka sadržanih u ACCESS studiji (A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis) (1) i to prema kliničkim, radiološkim i histološkim nalazima. Kod svih pacijenata dijagnoza bolesti je postavljena biopsijom određenog tkiva/organa u kome je potvrđeno postojanje nekazeifikovanih epitelioidnih granuloma. Ako je granulomatozna inflamacija bila neke druge neinfektivne ili infektivne prirode, takvi pacijenti su bili isključeni iz studije. Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja su bili i postojanje druge hronične plućne bolesti, maligniteta, srčane insuficijencije, autoimunskog oboljenja, hronične endokrine, bubrežne i bolesti jetre. Svi pacijenti su bili ambulantno i/ili hospitalno ispitivani i lečeni na Klinici za plućne bolesti Kliničkog centra Srbije u Beogradu.

U vreme uključivanja u studiju, 85,45% pacijenata je bilo na terapiji prednizolonom; 12,68% na kombinovanoj terapiji prednizolonom i metotreksatom dok je 1,87% pacijenata primalo samo metotreksat. Primenjena je niska dnevna doza prednizolona (medijana: 10 mg; interkvartilni raspon: 5-10 mg) tokom $24,5 \pm 16,4$ meseca (medijana: 24 meseca; interkvartilni raspon: 12-39 meseci). Metotreksat je primenjivan jednom nedeljno (medijana: 5 mg; interkvartilni raspon: 5-10 mg) tokom $9,4 \pm 4,2$ meseca. Pacijenti uključeni u studiju nisu uzimali lekove i/ili suplemente za snižavanje koncentracije holesterola niti su koristili neku antioksidativnu suplementaciju.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 142 pacijenta sa isključivo plućnom manifestacijom sarkoidoze i 71 pacijent sa kombinovanom plućnom i vanplućnom bolešću (sa dodatnom manifestacijom na nervnom sistemu – 23; na očima – 17; na srcu – 20; na koži - 11). Što se tiče toka bolesti, 94 pacijenta je imalo akutnu bolest, a kod 119 je bolest bila hronična.

Zahvaćenost pluća procenjena je prema radiografskom stadijumu (0 –normalni plućni nalaz; I – bilateralna hilarna limfadenopatija (BHLA); II – BHLA udružena sa promenama u plućnom parenhimu; III – parenhimski plućni infiltrati bez BHLA; IV – plućna fibroza (bulozne, cistične, emfizematozne promene)). Na osnovu rezultata plućne radiografije, 10,18% pacijenata

je bilo u stadijumu 0; 21,3% se nalazilo u stadijumu I; 48,53% je bilo u stadijumu II dok se u stadijumu III nalazilo 19,99% pacijenata. Nijedan pacijent nije bio u stadijumu IV.

U analizu je bilo uključeno i 139 zdravih ispitanika (88 žena i 51 muškarac), prosečne starosti $47,9 \pm 10,1$ godina koji su dobrovoljno pristali da učestvuju u studiji tokom sistematskog pregleda koji je obavljen na Farmaceutskom fakultetu. Kriterijumi izbora zdravih ispitanika podrazumevali su odsustvo plućnih, kardiovaskularnih, cerebrovaskularnih, renalnih, hepatičnih ili malignih bolesti.

Istraživanje je planirano i sprovedeno prema etičkim principima u skladu sa Helsinškom deklaracijom i na osnovu odobrenja Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije i Etičkog komiteta za klinička ispitivanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ispitanici su bili upoznati sa ciljevima studije i uključeni su u istraživanje nakon što su potpisali pristanak za učešće.

3.2. Uzorci

Uzorci venske krvi su prikupljeni u jutarnjim časovima, posle 12-časovnog noćnog gladovanja u epruvete za serum i EDTA plazmu. Uzorci su centrifugirani na $2500 \times g$ tokom 15 minuta, a zatim su serum i plazma odvajani u alikvote i čuvani na -80°C do trenutka analiziranja.

Pored seruma i plazme, pripremani su i hemolizati eritrocita. Nakon izdvajanja plazme, sediment krvnih ćelija je ispiran 3 puta izotoničnim rastvorom NaCl da bi se uklonili ostaci plazme, leukociti i trombociti. Nakon svakog dodatka rastvora NaCl, suspenzija ćelija je blago promešana, a zatim centrifugirana na $2500 \times g$ tokom 10 minuta. Dobijeni supernatant iznad krvnih ćelija je uklanjao vakuum pumpom pri čemu su se uklanjali ostaci plazme, leukociti i trombociti. Nakon što je ova procedura ponovljena 3 puta, sediment eritrocita je tretiran sa dvostruko većom zapreminom ledeno hladne destilovane vode da bi se dobio hemolizat. Takav hemolizat je zatim centrifugiran na $2500 \times g$ tokom 15 minuta da bi se uklonile membrane eritrocita. Za dalju analizu korišćeni su supernatanti dobijeni nakon ovog centrifugiranja, koji su čuvani na -80°C do izvođenja analiza.

Neposredno pre izvođenja laboratorijskih analiza, alikvoti seruma, plazme i hemolizata su odmrzavani. Hemolizati eritrocita su bili dodatno razblaženi u određenim odnosima destilovanom vodom kako bi merenja biohemijskih parametara mogla da se izvedu.

3.3. Parametri plućne funkcije

Procena plućne funkcije je rađena u Kliničkom centru Srbije pod nadzorom specijaliste za plućne bolesti. Parametri koji su određivani su forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV₁), forsirani vitalni kapacitet (FVC) i difuzni kapacitet pluća za CO (DLCO). Za određivanje FEV₁ i FVC korišćena je metoda spirometrije uz merenje pomoću pneumotahografa dok je za određivanje DLCO korišćena tzv. “single breath” metoda (Masterlab, Jaeger, Wurzburg, Germany). Dobijeni rezultati su izraženi kao procenat vrednosti- normi predviđenih za godine i pol.

3.4. Određivanje koncentracije osnovnih biohemijskih i parametara lipidnog profila

Serumske koncentracije glukoze, ureje, kreatinina, mokraćne kiseline, ukupnih proteina, albumina, UH, HDL-H, TG su određene rutinskim automatizovanim laboratorijskim metodama pomoću enzimskih i neenzimskih reagenasa (BioSystems, Barcelona, Spain) na biohemijskom analizatoru (ILAB 600, Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Koncentracija LDL-H je izračunata pomoću Friedwaldove formule (114) za osobe čija je koncentracija TG bila manja od 4,5 mmol/L dok je za ostale određen uz direktni test za LDL-H (BioSystems, Barcelona, Spain). Niskim koncentracijama HDL-H smatrane su vrednosti $\leq 1,0$ mmol/L dok su za visoke koncentracije TG uzete vrednosti $\geq 1,70$ mmol/L (115). Hemoglobin u hemolizatu je određen Drabkinovom metodom kao cijanmethemoglobin na spektrofotometru Beckman DU-60 (Beckman Instruments, Fullerton, California, USA).

3.5. Određivanje markera inflamacije

3.5.1. Određivanje hsCRP-a i ACE

Koncentracija hsCRP-a u serumu je izmerena primenom imunoturbidimetrijske metode na lateks česticama (Quantex hsCRP kit; BLOKIT, Barcelona, Spain) na ILAB 600 analizatoru. Serumski ACE je određen kolorimetrijskom metodom sa komercijalno dostupnim testom sa p-hidroksibenzoil-glicil-L-histidil-L-leucinom kao supstratom (Fujirebio Diagnostics, Malvern, PA, USA) na ILAB 600 analizatoru.

3.5.2. Određivanje koncentracije SAA

Koncentracija SAA je određena komercijalnim SAA (sendvič) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testom (Immunology Consultants Laboratory, Portland, OR, USA).

Princip metode se zasniva na tome da su dna bunarčića ELISA ploče obložena monoklonskim anti-SAA antitelima. Po dodatku seruma koji sadrži SAA, on se vezuje za anti-SAA antitela. Nakon ispiranja nevezanih proteina, dodaju se sekundarna anti-SAA antitela konjugovana sa peroksidazom rena i ova antitela obeležena enzimom formiraju kompleks sa SAA koji je prethodno vezan za primarna anti-SAA antitela. Nakon još jednog ispiranja kojim se uklanjaju nevezana antitela, dodaje se supstrat hromogen, 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin (TMB) u kombinaciji sa H₂O₂. TMB se oksiduje u prisustvu peroksidaze i nastaje obojeni hromogen čija se apsorbcija meri na 450 nm pomoću ELISA čitača (*Pharmacia LKB, Wien, Austria*). Intenzitet boje hromogena je proporcionalan vezanoj peroksidazi tj. količini vezanih sekundarnih antitela, pa tako i koncentraciji SAA u uzorku. Koncentracija SAA u uzorku može da se dobije iz standardne krive koja se konstruiše iz standardnih rastvora, a zatim koriguje za primenjeno razblaženje uzorka.

Komponente komercijalnog testa:

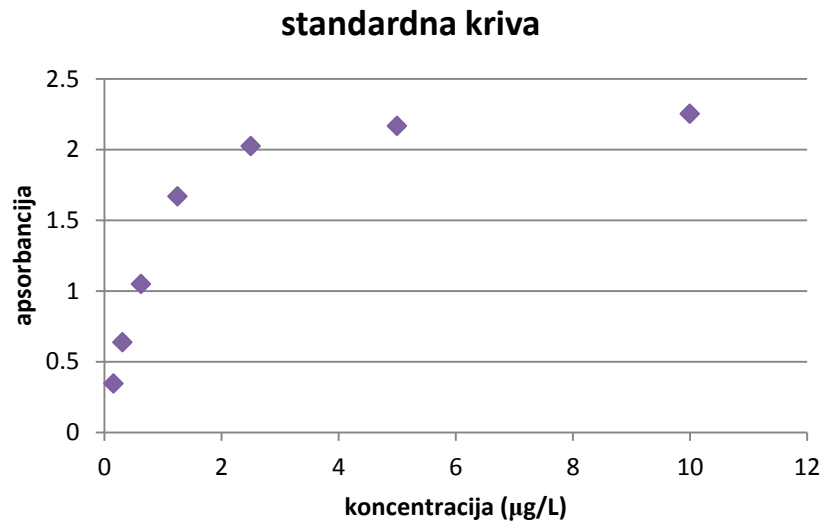
1. Diluent pufer (koncentrat) - razblažuje se destilovanom vodom u odnosu 1:5
2. Rastvor za ispiranje ploča (koncentrat) – razblažuje se destilovanom vodom u odnosu 1:20
3. Enzim-antitelo konjugat (konjugat sekundarnih anti-SAA antitela i enzima peroksidaze iz rena) – razblažuje se diluent puferom u odnosu 1:100 (za celu ploču bilo je potrebno 100 µL osnovnog konjugata i 9900 µL diluent pufera)
4. Hromogen-supstrat rastvor (TMB i H₂O₂ u citratnom puferu pH= 3,3) – reagens je spreman za upotrebu
5. Stop rastvor- rastvor za zaustavljanje reakcije (0,3 M H₂SO₄) –reagens je spreman za upotrebu
6. ELISA ploča – ploča obložena visoko-afinitetnim monoklonskim anti-SAA antitelima.
7. Humani SAA kalibrator (liofilizovani kalibrator) –dodati 1 mL destilovane ili dejonizovane vode za rekonstituciju liofilizata i promešati. Koncentracija tako dobijenog kalibratora je 12,18 µg/mL. Kalibrator se dalje razblažuje da bi se dobila serija standardnih rastvora određene koncentracije. Koncentracije standardnih rastvora i njihova priprema je data u Tabeli 2.

Tabela 2. Koncentracije standardnih rastvora i njihova priprema

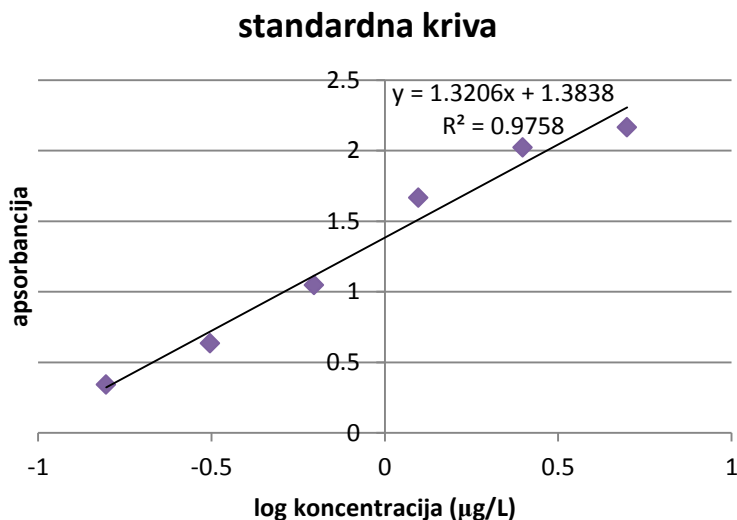
Standard	$\mu\text{g/L}$	Zapremina	Zapremina diluenta
7	100	6 μL osnovnog SAA	725 μL
6	50	300 μL standarda 7	300 μL
5	25	300 μL standarda 6	300 μL
4	12,5	300 μL standarda 5	300 μL
3	6,25	300 μL standarda 4	300 μL
2	3,125	300 μL standarda 3	300 μL
1	1,56	300 μL standarda 2	300 μL
0*	0		600 μL

*označava slepu probu reagensa

Grafici standardne krive su prikazani na Slici 7.



a)



b)

Slika 7. Standardna kriva za određivanje koncentracije SAA, a) zavisnost apsorbancije od koncentracije, b) zavisnost apsorbancije od logaritmovanih vrednosti koncentracije

Izvođenje testa:

1. Temperirati sve reagense na sobnu temperaturu
2. Pipetirati po 100 µL slepe probe reagensa, svih standardnih rastvora i uzoraka (u radu smo koristili uzorke seruma razblažene u odnosu 1:10) u odgovarajuće bunarčice na ploči
3. Ploču pokriti zaštitnom folijom i inkubirati 60 minuta na sobnoj temperaturi
4. Nakon inkubacije, aspirirati sadržaj bazenčića.
5. Isprati ploču 4 puta rastvorom za ispiranje ploča. Između svakog ispiranja, istresti ploču na papirnu vatu kako bi se što bolje uklonio rezidualni pufer za ispiranje.
6. Pipetirati po 100 µL razblaženog enzim-antitelo konjugata u svaki bunarčić. Pokriti ploču i inkubirati 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi.
7. Aspirirati sadržaj ploče i ponoviti postupak pod brojem 5.
8. Pipetirati po 100 µL TMB supstratnog rastvora u svaki bunarčić.

9. Inkubirati 10 minuta u mraku na sobnoj temperaturi.

10. Nakon 10 minuta, dodati po 100 μ L stop rastvora u svaki bunarčić.

11. Očitati apsorbancije standarda i uzoraka na ELISA čitaču na 450 nm. Konstruisati kalibracionu krivu na osnovu koncentracija i apsorbancija standarda i zatim očitati koncentracije uzoraka koristeći kalibracionu krivu. Boja je stabilna najviše 2 sata.

3.6. Određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa

Parametri oksidativno-stresnog statusa su određivani u serumu i hemolizatima eritrocita pacijenata sa sarkoidozom i kontrolne grupe.

3.6.1. Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) u serumu i eritrocitima

Princip metode se zasniva na tome da krajnji proizvodi lipidne peroksidacije mogu da reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) u odnosu 1:2 i obrazuju crveno-obojeni kompleks MDA-TBA koji može da se meri spektrofotometrijski na 535 nm (42).

Hemikalije i reagensi:

TBA Reagens - 0,917 mmol/L trihlorsirćetna kiselina (TCA, 15% rastvor), 2,6 mol/L (0,375%) TBA-tiobarbiturna kiselina, 0,25 mol/L HCl. Sve ove komponente se rastvaraju u destilovanoj vodi, reagens se čuva u frižideru, na +4°C.

Koncentrovani standard MDA, 164,1 mmol/L - malonaldehid bis(dimetil acetal) ili 1,1,3,3-tetraetoksiopropan.

Izvođenje:

Primenom metode standardne krive određena je koncentracija MDA. Najpre je napravljena serija od 7 odgovarajućih standarda MDA u rasponu koncentracija od 0,156 do 10 μ mol/L. Na osnovu izmerenih apsorbancija standarda i njihovih poznatih koncentracija, konstruisana je standardna kriva. Standardna kriva je zadovoljavala uslove linearne regresione analize i na osnovu izmerenih apsorbancija analiza, dobijena je koncentracija MDA u uzorcima. Merenje apsorbancija standarda i analiza se vršilo na spektrofotometru Beckman DU-60.

U epruvete pipetirati (mL)			
	Slepa proba	Standard	Analiza
Destilovana voda	0,3	-	-
Standard	-	0,3	-
Uzorak*	-	-	0,3
TBA reagens	0,6	0,6	0,6

Promešati i inkubirati na 100⁰C u vodenom kupatilu 5 minuta. Ohladiti, centrifugirati na 10000g tokom 10 minuta na +4⁰C i očitati apsorbanciju na 535 nm.

*Kao uzorak se koristio serum ili hemolizat eritrocita

Da bi izmerena apsorbancija u hemolizatima eritrocita bila u opsegu standardne krive, hemolizati su razblaženi destilovanom vodom u odnosu 1:20, a zatim su ovako dobijene koncentracije podeljene koncentracijom hemoglobina u uzorku da bi se dobile finalne koncentracije MDA.

3.6.2. Određivanje koncentracije totalnog oksidativnog statusa (TOS) u serumu i eritrocitima

Princip metode se zasniva na činjenici da ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju fero jon-ortodianizidin kompleks u feri jon koji zatim reaguje sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini i nastaje obojeni kompleks koji se meri spektrofotometrijski (λ_{\max} = 560 nm). Reakcija oksidacije je olakšana glicerolom koji je prisutan u reakcionom medijumu (43).

Hemikalije i reagensi

TOS 1 reagens: Pripremljen je rastvaranjem ksilenol-oranža (114 mg) i NaCl (8,18 g) u 900 mL rastvora H₂SO₄ (c=25 mmol/L). U tako dobijeni rastvor dodato je 100 mL glicerola. pH vrednost ovog reagensa treba podesiti na 1,75.

TOS 2 reagens: Pripremljen je rastvaranjem feroamonijum sulfata (1,96 g) i o – dianizidin dihidrohlorida (3,17g) u 1000 mL rastvora H₂SO₄ (c= 25 mmol/L).

Izvođenje:

Koncentracija TOS-a u uzorku je određena metodom standardne krive. Kao standard korišćen je vodeni rastvor H₂O₂ u opsegu koncentracija od 5 do 50 μ mol/L uz primenu kontrolnog rastvora od 20 μ mol/L. Na osnovu izmerenih apsorbancija standarda i njihovih poznatih koncentracija,

konstruisana je standardna kriva. Standardna kriva je zadovoljavala uslove linearne regresione analize i na osnovu izmerenih apsorbancija analiza, dobijena je koncentracija TOS-a u uzorcima. Merenje je rađeno na ILAB 300+ biohemijskom analizatoru uz primenu filtera od 546 nm.

	Analiza (μL)	Standard (μL)	Slepa proba (μL)
TOS 1	450	450	450
TOS 2	22	22	-
Uzorak*	70	-	-
Standard	-	70	-
Destilovana voda	-	-	70

U reakcionoj kivetici se pomešaju sve komponente, inkubira se 3-4 minuta i očita apsorbancija na 546 nm.

*Kao uzorak se koristio serum ili hemolizat eritrocita

Da bi izmerena apsorbancija u hemolizatima eritrocita bila u opsegu standardne krive, hemolizati su razblaženi destilovanom vodom u odnosu 1:20, a zatim su ovako dobijene koncentracije podeljene koncentracijom hemoglobina u hemolizatu.

3.6.3. Određivanje nivoa superoksid-anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) u hemolizatima eritrocita

Za određivanje $O_2^{\cdot-}$ primenjena je Auclair-Voisinova metoda (116) gde $O_2^{\cdot-}$ redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitroblue-tetrazolijuma (NBT, 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difetil)-ditetrazolijum hlorid) do mono- i diformazana. Diformazan koji nastaje potpunom redukcijom NBT-a, je nerastvorljiv u vodi i zbog toga je neophodno dodati želatin čija je uloga da održava diformazan u rastvornom obliku. Da bi redukcija NBT-a do diformazana bila potpuna i odgovarajuća za merenje, neophodno je inhibirati spontanu dismutaciju kiseonika koja kompetira reakciji redukcije NBT-a. To se postiže smanjenjem pritiska kiseonika u medijumu, a kroz uvođenje azota pod pritiskom u trajanju od 1h u NBT reagens. Brzina promene boje žutog NBT-a u plavi formazan predstavlja nivo stvaranja $O_2^{\cdot-}$ i meri se spektrofotometrijski na 550 nm.

Hemikalije i reagensi

Fosfatni pufer: 0,05 mol/L, pH 8,6 (kalijum-dihidrogenfosfat i dinatrijum-monohidrogenfosfat) uz dodavanje EDTA u koncentraciji od 0,1 mmol/L.

Radni reagens: nitrobluetetrazolijum [NBT, 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difenilen-ditetrazolijum] hlorid uz dodatak želatina u fosfatnom puferu.

Izvođenje

Brzina redukovanja NBT-a se određuje kinetičkim postupkom, a izračunava se upotrebom molarnog apsorpcionog koeficijenta monoformazana. Bitno je da se naglasi da je reakcija redukcije NBT-a pomoću superoksidnog anjona jako brza, tako da se posle 60 sekundi reakcija završava. Uočeno je da je samo u prvih 60 sekundi reakcija linearna. Merenje brzine redukcije NBT-a je rađeno na spektrofotometru Beckman DU-60 (Beckman Instruments).

Pipetirati u kivetu (mL):	
Radni reagens	1,00
Hemolizat	0,05
Promešati i pratiti povećanje apsorbancije na 550 nm, na svakih 15 sekundi u toku jednog minuta. Izračunati $\Delta A/\text{min}$	

Brzina redukcije NBT-a se izračunava prema sledećem izrazu:

$$\text{red. NBT, } \mu\text{mol} / \text{min} / L = \frac{\Delta A / \text{min} \times V_{uk}}{\varepsilon \times l \times V_{uz}} \times 10^6 = \frac{\Delta A / \text{min} \times 1,05}{15000 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 0,05 \text{ mL}} \times 10^6$$

gde su:

V_{uk} - 1,05 mL (ukupna zapremina u kiveti).

V_{uz} - 0,05 mL (zapremina uzorka u kiveti).

l - dužina svetlosnog puta (1 cm).

ε - molarni apsorpcioni koeficijent monoformazana ($15\ 000 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

10^6 - faktor za prevođenje mol u μmol .

Krajnji izraz za izračunavanje glasi:

$$\text{red. NBT, } \mu\text{mol} / \text{min} / L = \Delta A / \text{min} \times 1400$$

Da bi izmerena promena apsorbancije u hemolizatima eritrocita bila merljiva, hemolizati su razblaženi destilovanom vodom u odnosu 1:20, a zatim su ovako dobijene brzine redukcije NBT-

a podeljene koncentracijom hemoglobina u uzorku da bi se dobile finalne brzine redukcije NBT- a tj. brzine generisanja $O_2^{\cdot-}$.

3.6.4. Određivanje koncentracije prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) u serumu

Za izvođenje PAB testa korišćena je metoda Hamidi-Alamdaria i saradnika (48, 49) uz određene modifikacije. PAB testom se određuje koncentracija H_2O_2 u antioksidativnom okruženju. Hromogen TMB reaguje istovremeno i sa H_2O_2 sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) pošto se nalaze u istoj sredini. Enzim peroksidaza katalizuje reakciju H_2O_2 i hromogena kada nastaje oksidovani TMB kao plavo obojeni proizvod. Reakcija mokraćne kiseline i hromogena nije enzimski katalizovana i tada se TMB katjon redukuje do bezbojnog proizvoda. Intenziteti obojenja standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina H_2O_2 i mokraćne kiseline. Metoda je spektrofotometrijska i na 450 nm se meri apsorbancija koja je srazmerna ravnoteži između prisutnih oksidanasa i antioksidanasa.

Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnim rastvorima pomnožen sa 6. Ovu multiplikaciju su predložili Alamdari i saradnici kako bi povećali opseg vrednosti koje pokriva standardna kriva, pa se i više HK jedinica može naći u tom rasponu.

Hemikalije i reagensi

1. **TMB I rastvor:** 60 mg TMB se rastvori u 10 mL dimetilsulfoksida (DMSO), rastvor se podeli na zapremine od 1,1 mL i čuva na $-20^{\circ}C$
2. **TMB katjon:** Za pripremu TMB katjona 1 mL TMB/DMSO (TMB I) se dodaje u 50 mL acetatnog pufera (0,05M, pH 4,5), zatim se dodaje 175 μ L sveže pripremljenog hloramina T (100 mmol/L), dobro se promeša i inkubira 1 sat na $37^{\circ}C$, na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon inkubacije u 50 mL TMB katjona dodaje se 25 U enzima peroksidaze. Dobijeni rastvor se pažljivo promeša, podeli u zapremine od 1,1 mL i čuva na $-20^{\circ}C$.
3. **TMB II rastvor:** 200 μ L TMB/DMSO se rastvori u 10 mL acetatnog pufera (0,05 mol/L, pH 5,6). Ovako pripremljen rastvor najbolje je koristiti odmah ili maksimalno u roku od 2 dana, pri čemu se čuva na temperaturi od $4^{\circ}C$.

4. Radni rastvor: 1 mL TMB katjona se doda u 10 ml TMB rastvora II i 6 minuta se meša na sobnoj temperaturi i na tamnom mestu. Ovako pripremljen radni rastvor se koristi odmah.

5. Standardni rastvor: Standardni rastvori se pripremaju mešanjem različitih odnosa (0-100%) 1 mmol/L H₂O₂ sa rastvorom mokraćne kiseline 6 mmol/L (rastvorenom u 10 mmol/L NaOH). Priprema standardnih rastvora prikazana je u Tabeli 3.

Tabela 3. Način pripreme standardnog rastvora za PAB test mešanjem mokraćne kiseline i H₂O₂ u različitim odnosima

Standardni rastvor	1	2	3	4	5
Mokraćna kiselina (μL)	100	75	50	25	0
H ₂ O ₂ (μL)	0	25	50	75	100

Izvođenje

Kao što je već navedeno, za pravljenje standardne krive se koriste rastvori H₂O₂ i mokraćne kiseline u različitim odnosima. Kapacitet prisutnih antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj kiselini i izražava u μmol/L mokraćne kiseline, a kapacitet prooksidanasa se kalibriše prema H₂O₂ i izražava u μmol/L H₂O₂. Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa jer ne reaguju jedna sa drugom i ne ometaju aktivnost jedna drugoj prema hromogenu. Na osnovu izmerenih apsorbancija standarda i njihovih poznatih koncentracija, konstruisana je standardna kriva. Standardna kriva je zadovoljavala uslove linearne regresione analize i na osnovu izmerenih apsorbancija analiza, dobijena je koncentracija PAB-a u uzorcima. Postupak se izvodi na ELISA ploči, a merenje na ELISA čitaču na 450 nm (*Pharmacia LKB, Wien, Austria*).

Pipetirati u bunarčice ELISA ploče (μL)			
	Slepa proba	Standard	Analiza
Destilovana voda	10	-	-
Standard	-	10	-
Serum	-	-	10
Radni rastvor	180	180	180

Promešati, inkubirati 12 minuta na 37 ⁰ C na tamnom mestu, zatim dodati:			
HCl (2 mol/L)	40	40	40
Promešati i očitati apsorbancije na 450 nm			

3.6.5. Određivanje koncentracije totalnog antioksidativnog statusa (TAS) u serumu

Koncentracija TAS-a određena je metodom po Erelu (47). Princip metode sastoji se u tome da se obojeni 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolidin)-6-sulfonat (ABTS)⁺ katjon u prisustvu antioksidanasa u uzorku redukuje do bezbojnog ABTS-a što se manifestuje smanjenjem intenziteta boje ABTS rastvora na 660 nm. Intenzitet boje obrnuto je srazmeran koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku.

Hemikalije i reagensi

TAS 1: Acetatni pufer (pH = 5,8; 0,4mol/L)

Priprema se mešanjem 940 mL CH₃COONa (0,4 mol/L) i 60 mL CH₃COOH (0,4 mol/L) za 1000 mL rastvora (prvo se dodaje bazna komponenta, a potom kisela dok se ne postigne potrebna pH vrednost). Rastvor pufera je stabilan šest meseci na temperaturi od +4°C.

TAS 2: Rastvor ABTS-a

Priprema se mešanjem 30 ml acetatnog pufera (pH=3,6; 30 mmol/L), 70 ml rastvora H₂O₂ (2 mmol/L). Potom se 0,549 g čvrstog ABTS-a rastvori u 100 mL prethodno pripremljenog rastvora (finalna koncentracija rastvora ABTS-a je 10 mmol/L). Inkubira se 1h na sobnoj temperaturi, dok rastvor ne poprimi karakterističnu intenzivnu plavo-zelenu boju ABTS⁺ jona. Ovako pripremljen reagens je stabilan šest meseci na 4°C.

Rastvor Troloksa: Kao standard koristi se hidrosolubilni analog vitamina E – *Trolox* (6 – hidroksi - 2,5,7,8 - tetrametilhroman - 2 - karboksilna kiselina, Mr=250,29 g/mol). Rastvor Troloxa priprema se rastvaranjem u fosfatnom puferu, pH=7,4; 30 mmol/L.

Izvođenje

Koncentracija prisutnih antioksidanasa u uzorku određuje se upotrebom standardne krive. Najčešće upotrebljavani standard za određivanje TAS je Trolox, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E. Kako se on teško rastvara u vodi, za pripremu rastvora korišćen je 30 mmol/L fosfatni pufer, pH=7,4. Dobijeni rezultati izražavaju se u *mmol/L Trolox ekvivalenta*. Pri konstruisanju standardne krive korišćeni su rastvori Troloksa rastućih koncentracija i to: 0,125 mmol/L; 0,25 mmol/L; 0,5 mmol/L; 0,75 mmol/L; 1 mmol/L; 1,5 mmol/L; 2 mmol/L. Na osnovu izmerenih apsorbancija standarda i njihovih poznatih koncentracija, konstruisana je standardna kriva. Standardna kriva je zadovoljavala uslove linearne regresione analize i na osnovu izmerenih apsorbancija analiza, dobijena je koncentracija TAS-a u uzorcima. Merenje je rađeno na ILAB 300+ biohemijskom analizatoru na 620 nm.

	Analiza (μL)	Standard (μL)	Slepa proba (μL)
TAS 1	200	200	200
TAS 2	37,5	37,5	37,5
Uzorak	12,5	-	-
Standard	-	12,5	-
Destilovana voda	-	-	12,5

U reakcionoj kiveri se pomešaju sve komponente, inkubira se 5 minuta na 37⁰C i očitava apsorbancija na 620 nm.

3.6.6. Određivanje koncentracije ukupnih sulfhidrilnih (SH) grupa u plazmi i eritrocitima

Koncentracija ukupnih SH grupa je određena Ellmanovom metodom (117) u kojoj alifatični tioli u baznoj sredini reaguju sa 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoevom kiselinom (DTNB) pri čemu nastaje obojeni p-nitrofenol. Nastali p-nitrofenol je anjon u baznoj sredini (pH 9) i određuje se spektrofotometrijski na 412 nm. Jedan mol tiola daje jedan mol p-nitrofenola.

Hemikalije i reagensi

Fosfatni pufer: 0,2 mol/L dikalijum-hidrogenfosfat, 2 mmol/L EDTA, pH 9,0

Radni reagens: 10 mmol/L DTNB, rastvoren u 50 mmol/L fosfatnog pufera, pH 7,0

Standardni rastvor GSH 1 mmol/L

Izvođenje

Koncentracija SH grupa je određivana primenom standardne krive uz vodeni rastvor redukovano glutationa (GSH) kao standarda. Pravi se rastvor GSH od 1 mmol/L, a od njega dalje se prave razblaženja destilovanom vodom tj. standardi nižih koncentracija, pa standardna kriva pokriva opseg koncentracija od 0,1 do 1 mmol/L. Merenje je rađeno na ILAB 300+ biohemijskom analizatoru od 450 nm.

	Analiza (μL)	Standard (μL)	Slepa proba (μL)
Pufer	900	900	950
Uzorak*	50	-	-
Standard	-	50	-
DTNB reagens	20	20	20

U reakcionoj kiveti se pomešaju sve komponente, inkubira se 25 minuta na 25⁰C u mraku i očitava apsorbancija od 450 nm.

*Kao uzorak se koristila plazma ili hemolizat eritrocita

Da bi izmerena apsorbancija u hemolizatima eritrocita bila u opsegu standardne krive, hemolizati su razblaženi destilovanom vodom u odnosu 1:100, a zatim su ovako dobijene koncentracije podeljene koncentracijom hemoglobina u hemolizatu.

3.6.7. Određivanje aktivnosti enzima superoksid-dizmutaze (SOD) u plazmi i eritrocitima

Metoda za određivanje aktivnosti SOD-a (118) zasniva se na sposobnosti SOD-a da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini na pH 10,2. Autooksidacija adrenalina može biti inicirana različitim agensima npr. tragovima teških metala. Aktivnost SOD-a se dobija merenjem apsorbancije nastalog crvenog proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza). Aktivnost SOD se izražava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

Hemikalije i reagensi

Karbonatni pufer: 0,05 mmol/L pH 10,2 , kome je dodat 1 mmol/L EDTA

Hlorovodonična kiselina: 15 mmol/L

Osnovni rastvor adrenalina: 10 mmol/L, rastvoren u 15 mmol/L HCl.

Izvođenje

U metodi je izabrana je ona koncentracija adrenalina koja će u kontroli dati $\Delta A/\text{min}$ od 0,025 jer je utvrđeno da SOD tada postiže najveći procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Polazna koncentracija adrenalina je 10 mmol/L, pa se on razblažuje rastvorom HCl (15 mmol/L) do koncentracije koja će dati $\Delta A/\text{min}$ od 0,025. Relativna jedinica aktivnosti SOD-a predstavlja onu aktivnost pri kojoj se postiže 50% inhibicije autooksidacije adrenalina. Obzirom na definiciju relativne jedinice aktivnosti SOD-a, jedinična aktivnosti bi dovela do 50%-og smanjenja apsorbanacije tj. $\Delta A/\text{min}$ bi u tom slučaju bila 0,0125. Merenje je rađeno na ILAB 300+ biohemijском analizatoru uz primenu filtera od 450 nm. Aktivnost SOD se može izračunati preko sledeće proporcije:

$$0,0125 : 1U = [0,025 - (\Delta A/\text{min})] : X$$

pri čemu X označava aktivnost SOD u uzorku

Samo izvođenje analize se odvija prema sledećem postupku:

	Kontrola (μL)	Analiza (μL)
Uzorak*	-	10
Pufer	700	690
Adrenalin	50	50

Promešati, ostaviti na tamnom mestu na 25⁰C tokom 3 min (vreme preinkubacije), a zatim očitati apsorbanciju na svaki minut u toku naredna 3 min. Izračunati $\Delta A/\text{min}$ za kontrolu i analize.

*Kao uzorak se koristila plazma ili hemolizat eritrocita

Iz izračunatog $\Delta A/\text{min}$, koristeći prethodno navedenu proporciju, dobija se aktivnost SOD (X)

Za aktivnost u 1 mL plazme, X se množi razblaženjem uzorka (V_{uk}/V_{uz}), pa potom sa 1000 da bi se dobila aktivnost u 1L plazme.

$$SOD, U/L = X \times (V_{uk}/V_{uz}) \times 1000$$

Da bi izmerena apsorbancija u hemolizatima eritrocita bila merljiva, hemolizati su razblaženi destilovanom vodom u odnosu 1:20, a zatim su ovako dobijene aktivnosti podeljene koncentracijom hemoglobina u hemolizatu.

3.7. Određivanje statusa PON1

Određivanje PON1 statusa podrazumeva određivanje aktivnosti enzima prema dva nefiziološka supstrata: paraoksonu (POazna aktivnost) i diazoksonu (DZOazna aktivnost). Računanjem odnosa DZOaze/POaze za svaku individuu, dobija se fenotip aktivnosti za položaj 192 (99).

Za određivanje enzimske aktivnosti može da se koristi serum ili heparinizirana plazma. EDTA plazma se ne koristi jer je PON1 Ca^{2+} esteraza pri čemu onda EDTA kompleksira jone Ca^{2+} i onemogućava enzimsku aktivnost. U našem radu, korišćen je serum kao biološki materijal.

3.7.1. Određivanje POazne aktivnosti

Određivanje POazne aktivnosti zasniva se na delovanju enzima na supstrat paraokson kada dolazi do konverzije paraoksona do p-nitrofenola (119), a brzina stvaranja p-nitrofenola se meri na 405 nm. Promena apsorbancije se prati u toku 3 minuta, pa se računa $\Delta A/\text{min}$. Enzimska aktivnost se određuje na 25°C , na pH 8,5 uz upotrebu 1 mmol/L TRIS-HCl pufera i u prisustvu rastvora NaCl. Optimizacija metode za određivanje POazne aktivnosti je rađena sa različitim koncentracijama rastvora NaCl (od 1 do 4 mol/L) da bi se postiglo što bolje razdvajanje fenotipova. Aktivnost se izražava kao μmol stvorenog p-nitrofenola/min/L ili kao U/L.

Hemikalije i reagensi

Radni pufer – pošto su koncentracije NaCl bile različite, odmerene su i različite mase ove supstance za pripremu pufera (za koncentraciju od 1 mol/L, odmereno je 58 g NaCl; za 2 mol/L, odmereno je 116 g; za 3 mol/L – 174 g; za 4 mol/L – 232 g). NaCl je zatim rastvoren u 800 mL destilovane vode koja već sadrži 100 mL 1mol/L TRIS-HCl pufera (pH 8,5) i 2 mL 1 mol/L

rastvora CaCl₂. Rastvor se dopuni destilovanom vodom do 1000 mL i čuva na sobnoj temperaturi.

Diluent pufer – u 800 mL destilovane vode, doda se 10 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera (pH 8,5) i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl₂. Dopuni se destilovanom vodom do 1000 mL i čuva na sobnoj temperaturi.

Paraokson supstrat, 1,2 mmol/L – 12,9 μL paraoksiona se rastvori u 50 mL radnog pufera u normalnom sudu i snažno se promeša da bi se paraokson rastvorio. Rastvor je neophodno pripremati svež neposredno pre upotrebe.

Zasićen rastvor NaOH – rastvor NaOH, minimalne koncentracije 2 mol/L. Pošto je paraokson toksičan, ovaj rastvor se koristi za preostalu razgradnju paraoksiona i dekontaminaciju korišćenog posuđa. Takođe, na dno boce u koju se izliva tečnost nakon merenja, treba sipati svež, koncentrovan rastvor NaOH.

Izvođenje reakcije za određivanje POazne aktivnosti

Uzorak seruma se najpre razblažuje diluent puferom u odnosu 1:10. Merenje apsorbancije se zatim vršilo na ILAB 300+ analizatoru na 405 nm (kinetička metoda, vreme čitanja 3 minuta, temperatura 25⁰C).

Izračunavanje POazne aktivnosti

$$\text{POazna akt (U/L)} = \frac{\Delta A / \text{min} \times V_{\text{uk}}}{\epsilon \times 1 \text{ cm} \times V_{\text{uz}}} \times 10^6 = \frac{\Delta A / \text{min}}{18000 \frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{0,55}{0,05} \times 10 \times 10^6$$

gde su:

ΔA/min – promena apsorbancije po minuti

ε – molarni apsorpcioni koeficijent p-nitrofenola (18000 L x mol⁻¹ x cm⁻¹)

1 cm – dužina optičkog puta

V_{uk} – ukupna zapremina reakcione smeše

V_{uz} – zapremina uzorka

10^6 – faktor za prevođenje mol-a u μmol -e

10 – faktor inicijalnog razblaženja seruma (1:10)

Krajnja formula za računanje enzimske aktivnosti prema paraoksonu glasi:

$\Delta A/\text{min} \times 6111 = \text{U/L PON1 aktivnosti}$

3.7.2. Određivanje DZOazne aktivnosti

Određivanje diazoksonazne aktivnosti enzima zasniva se na delovanju enzima na supstrat diazokson (diazinon-O-analog) kada nastaje 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin (IMHP), a brzina stvaranja IMHP-a se meri na 270 nm (119). Promena apsorbancije se prati u toku 3 minuta, pa se računa $\Delta A/\text{min}$. Enzimska aktivnost se određuje na 23°C , na pH 8,5 uz upotrebu 1 mmol/L TRIS-HCl pufera i u prisustvu rastvora NaCl. Optimizacija metode za određivanje DZOazne aktivnosti je rađena sa različitim koncentracijama rastvora NaCl (od 1 do 4 mol/L) da bi se postiglo što bolje razdvajanje fenotipova. Aktivnost se izražava kao μmol stvorenog IMHP-a/min/L ili kao U/L.

Hemikalije i reagensi

Diazokson supstrat, 1,0 mmol/L – 2,8 μL diazoksona se rastvori u 10 mL radnog pufera u normalnom sudu i snažno se promeša da bi se diazokson rastvorio. Rastvor je neophodno pripremati svež neposredno pre upotrebe

Ostale hemikalije i reagensi su identični onima kod određivanja POazne aktivnosti

Izvođenje reakcije za određivanje DZOazne aktivnosti

Uzorak seruma se najpre razblažuje diluent puferom u odnosu 1:20. Merenje se zatim vršilo na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu, Japan) na 270 nm (kinetička metoda, vreme čitanja 3 minuta, temperatura 23°C).

Izračunavanje DZOazne aktivnosti

$$\text{DZOazna akt (U/L)} = \frac{\Delta A / \text{min} \times V_{\text{uk}}}{\varepsilon \times 1 \text{ cm} \times V_{\text{uz}}} \times 10^6 = \frac{\Delta A / \text{min}}{3000 \frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{0,80}{0,08} \times 20 \times 10^6$$

gde su:

$\Delta A / \text{min}$ – promena apsorbancije po minuti

ε – molarni apsorpcioni koeficijent IMHP-a ($3000 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

1 cm – dužina optičkog puta

V_{uk} – ukupna zapremina reakcione smeše

V_{uz} – zapremina uzorka

10^6 – faktor za prevođenje mol-a u μmol -e

20 – faktor inicijalnog razblaženja seruma (1:20)

Krajnja formula za računanje enzimske aktivnosti prema diazoksonu glasi:

$$\Delta A / \text{min} \times 66\,666 = \text{U/L PON1 aktivnosti}$$

3.7.3. Određivanje fenotipova enzima PON1

Nakon merenja aktivnosti enzima prema pomenutim supstratima, pristupa se crtanju grafika gde se na y-osi nalazi DZOazna, a na x-osi POazna aktivnost. Tačke na grafiku predstavljaju parove vrednosti POazne i DZOazne aktivnosti za svaku individuu i na osnovu njih može da se odredi fenotip enzima PON1 na položaju 192 (99, 119). Takođe, računat je odnos DZOazne prema POaznoj aktivnosti, konstruisani su histogrami raspodele ovih odnosa i primenom antimodal metode koju je opisao Adkins (120), određene su granice između fenotipova. Antimodalne vrednosti su vrednosti sa najmanjom frekvencom u skupu i one su predstavljale te granične vrednosti. Na ovaj način, dobijena su 3 fenotipa za položaj 192: RR, QR i QQ. U zavisnosti od primenjene koncentracije NaCl, kao i samih ispitanika (zdravi ili pacijenti sa sarkoidozom), razlikovale su se i granične vrednosti za fenotipove.

3.8. Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija

Za razdvajanje LDL i HDL subfrakcija, primenjena je metoda vertikalne elektroforeze na nenedenaturišućem, kompozitnom poliakrilamidnom gradijent (3-31%) gelu (121, 122). Razdvajanje lipoproteinskih subfrakcija, pod dejstvom jednosmerne struje i pri konstantnom naponu, se zasniva na njihovoj veličini.

3.8.1. Izlivanje kompozitnih gradijent (3-31%) gelova

Poliakrilamid različitih koncentracija predstavlja potporni medijum, a sa porastom njegove koncentracije, smanjuje se veličina pora. Kompozitni gradijent (3-31%) gelovi su pripremljeni uz sistem za izlivanje Hoefer SE 675 (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). Mešanjem 2 monomera različitih koncentracija postiže se odgovarajući koncentracioni gradijent.

Hemikalije i reagensi

TRIS pufer, pH 8,3 (90 mmol/L Tris, 80 mmol/L borna kiselina, 2,5 mmol/L Na₂EDTA)

3% rastvor akrilamida (28,8 g/L akrilamid i 1,2 g/L bis-akrilamid), degazira se i čuva na +4⁰C

31% rastvor akrilamida (292,5 g/L akrilamid i 17,05 g/L bis-akrilamid), degazira se i čuva na +4⁰C

Amonijum-persulfat (APS) rastvor (0,1 g se rastvori u 1 mL Tris pufera), priprema se *ex tempore*

Tetrametilen-diamid (TEMED)

Radni rastvor 3% akrilamida – 79 µL APS-a i 63 µL TEMED-a se doda u 140 mL 3% rastvora akrilamida; priprema se *ex tempore*

Radni rastvor 31% akrilamida – 487 µL APS-a, 13,8 µL TEMED-a i 7 mL 70% glicerola u 70 mL 31% rastvora akrilamida; priprema se *ex tempore*

Proteinski standardi velike molekulske mase (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). karboksilovane polistirenske čestice (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, CA, USA) i standardizovana humana plazma služili su za konstruisanje kalibracione krive za određivanje veličine LDL i HDL čestica.

Izvođenje

U komoru za izlivanje gelova postave se 4 kalupa i ceo sistem se smešta na nivelisanu površinu. Mešanje monomera i formiranje gradijenta omogućeno je primenom 2 peristaltičke pumpe tipa Masterflex L/S (Cole Parmer Instrumental Company, Vernon Hills, IL, USA) i softvera Masterflex Linkable Instrument Control Software (WinLIN). Gradijent koncentracija poliakrilamida se sastoji od 13 segmenata i svaki segment je sadržao različite koncentracije 3% i 31% akrilamida. Nakon formiranja 13 segmenata, upumpava se 70% glicerol da bi se gradijent gelova podigao do nivoa staklenih ploča. Kad se završi izlivanje, nanosi se određena zapremina Tris pufera (pH 8,3) na kalup za izlivanje gelova čime se sprečava isušivanje monomera tokom polimerizacije. Polimerizacija gelova se odvija preko noći na sobnoj temperaturi.

3.8.2. Gradijent-gel elektroforeza

Elektroforeza se izvodi u Tris puferu (pH 8,35) na temperaturi 8⁰C i u tu svrhu je korišćena vertikalna kada Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). Gelovi se najpre aktiviraju tokom 50 minuta na 290 V, a zatim sledi nanošenje uzoraka EDTA plazme, proteinskih standarda i standardizovane humane plazme. Elektroforeza se zatim izvodi prema protokolu: 1) 60 V u toku 13 min, 2) 170 V u toku 20 min i 3) 300 V u toku 20h.

Nakon što se završi elektroforeza, deo gela sa proteinskim standardima se odseca od ostatka gela, fiksira 1h u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline, boji u rastvoru Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Ostatak gela sa uzorcima se prvo fiksira u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline 1h, ispira u 45% etanolu tokom 30 minuta, a zatim boji rastvorom Sudan black B (Acros Organics, Geel, Belgium) preko noći.

3.8.3. Skeniranje gelova i evaluacija LDL i HDL subfrakcija

Pošto se gelovi sa proteinskim standardima i uzorcima odboje, sledi denzitometrijsko skeniranje na skeneru Image Scanner III (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) uz Image Quant softver (version 5.2, 1999; Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA). Denzitometrijski prikaz je omogućio određivanje dominantnog LDL i HDL dijametra tj. dijametra čestice koja zauzima najistaknutiji pik u LDL i HDL regionu. Relativni udeo (%) svake od subfrakcija u ukupnom LDL i HDL profilu određen je na osnovu površina ispod denzitometrijskog pika (85). Na osnovu poznatih raspona dijametara LDL čestica: LDL I (27,2-28,5 nm), LDL II (25,5-27,2

nm), LDL III (24,2-25,5 nm) i LDL IV (22,0-24,2 nm) vrši se njihova identifikacija na gelu. Zbir relativnih udela LDL III i LDL IV subfrakcija predstavlja relativni udeo malih, gustih LDL čestica. Pojedinačne HDL subfrakcije je moguće identifikovati uz poznate raspone njihovih dijametara: HDL 2b (9,7-12,0 nm), HDL 2a (8,8-9,7 nm), HDL 3a (8,2-8,8 nm), HDL 3b (7,8-8,2 nm) i HDL 3c (7,2-7,8 nm). Sabiranjem relativnih udela HDL 3a, HDL 3b i HDL 3c subfrakcija dobija se relativni udeo malih HDL čestica.

3.9. Statistička analiza

Normalnost distribucije je testirana Kolmogorov-Smirnov testom, kao i računanjem koeficijenata asimetrije (skewness) i zaobljenosti (kurtosis), a grafički je prikazana histogramima. Kontinuirani podaci, čija je raspodela sledila normalan tok, predstavljeni su kao aritmetičke srednje vrednosti i standardne devijacije. Ako je raspodela podataka imala normalnu distribuciju nakon logaritmovanja vrednosti, tada su rezultati dati kao geometrijske srednje vrednosti i 95% intervali pouzdanosti. Varijable čija raspodela nije pratila normalan tok ni nakon logaritamske transformacije, prikazane su kao medijane i interkvartilni rasponi. Za parametre koji slede normalnu raspodelu, kao i one koji slede takav oblik raspodele nakon logaritmovanja vrednosti, poređenje je rađeno Studentovim t-testom ili analizom varijanse (ANOVA) sa Tukey's *post-hoc* testom. Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testovi su korišćeni za utvrđivanje značajnosti razlike kod parametara koji nemaju normalnu distribuciju. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvence, a razlike među njima su proveravane χ^2 testom.

Spearmanova neparametarska korelaciona analiza je korišćena za utvrđivanje korelacije između različitih parametara, a multipla linearna regresiona analiza (*enter selekcija*) za identifikaciju nezavisnih prediktora pojedinih parametara. Multikolinearnost je takođe testirana za predložene modele i utvrđeno je da nijedna od varijabli u modelu ne pokazuje značajan uticaj na drugu varijablu unutar tog modela.

Prediktivna sposobnost pojedinih parametara proveravana je binarnom logističkom regresionom analizom dok su *Receiver Operating Characteristics* (ROC) krive korišćene u cilju procene dijagnostičke tačnosti ovih parametara.

Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je bio nivo verovatnoće (značajnosti – *p*) manji ili jednak 0,05.

Statistička analiza izvedena je primenom MedCalc softvera (MedCalc ver. 11.4 Software, Belgium), MS Excel-a i PASW Statistics Version 18.0. (SPSS software, IBM Corporation, USA) softverskog paketa.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Osnovni demografski i klinički parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata sa sarkoidozom

U ispitivanju je učestvovalo 213 pacijenata i 139 zdravih ispitanika. Dobijeni su podaci o starosti, visini, težini, parametrima plućne funkcije i radiografskom stadijumu. Pacijenti i kontrolna grupa su bili upareni prema godinama i polu. Indeks telesne mase je bio značajno viši kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. U Tabeli 4 su prikazane i vrednosti parametara plućne funkcije za grupu pacijenata.

Tabela 4. Osnovni demografski podaci, parametri plućne funkcije i radiografski stadijum u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata

Parametar	Kontrolna grupa	Sarkoidoza	P ^a
Broj ispitanika	139	213	
Starost (godine)	47,9±10,1	51,6± 10,8	0,135
Muškarci, n (%)‡	51 (36,7)	75 (35,2)	0,777 ^b
Žene, n (%)‡	88 (63,3)	138 (64,8)	
ITM (kg/m ²)	25,1 ± 4,0	29,1 ± 2,7	< 0,01
FEV ₁ (%) #	/	43-127 (83 ± 7)	/
FVC (%) #	/	50-123 (93 ± 4)	/
DLCO (%) #	/	41-107 (80 ± 3)	/
Plućni radiografski stadijum 0/I/II/III/IV (%)	/	10,18/21,3/48,53/19,99/0	/

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (ako nije drugačije naznačeno)

‡ Podaci su prikazani kao apsolutne i (relativne) frekvence

Podaci su prikazani kao opseg: minimalna – maksimalna vrednost (srednja vrednost ± standardna devijacija)

^a Studentov t-test

^b Chi-kvadrat test

4.2. Osnovni biohemijski i lipidni parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata sa sarkoidozom

Osnovni biohemijski i lipidni parametri su određeni kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Osnovni biohemijski i lipidni parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata

Parametar	Kontrolna grupa	Sarkoidoza	P ^a
Glukoza (mmol/L)	4,78 ± 0,71	5,41 ± 2,33	0,119
Urea (mmol/L)	5,80 ± 1,70	5,62 ± 1,65	0,265
Kreatinin (μmol/L)	79,2 ± 15,7	79,7 ± 14,9	0,787
Mokraćna kiselina (μmol/L)	284 ± 106	288 ± 80	0,678
Ukupni proteini (g/L)	70,5 ± 5,4	72,1 ± 7,0	<0,05
Albumin (g/L)	35,1 ± 1,5	43,8 ± 3,3	<0,01
UH (mmol/L)	5,57 ± 1,20	6,2 ± 1,53	<0,05
LDL-H (mmol/L)	3,58 ± 1,06	3,97 ± 1,38	0,352
HDL-H (mmol/L)	1,52 ± 0,39	1,31 ± 0,43	<0,01
TG (mmol/L) #	1,28 (1,17-1,40)	1,90 (1,76-2,04)	<0,001
TG/HDL-H	1,08 ± 0,57	2,03 ± 0,45	<0,001
Nizak HDL-H (%)	10,4	28,2	<0,05
Hipertrigliceridemija (%)	31,2	57,4	<0,01

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (ako nije drugačije naznačeno)

Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti

^a Studentov t-test

Koncentracije ukupnih proteina, albumina, UH, TG, kao i aterogenog indeksa TG/HDL-H su bile značajno veće, a koncentracija HDL-H je bila značajno niža kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, hipertrigliceridemija i niska koncentracija HDL-H je značajno više zastupljena u grupi pacijenata.

4.3. Inflamatorni parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata sa sarkoidozom

Kako je sarkoidoza u osnovi inflamatorno oboljenje, određeni su parametri inflamacije kod kontrolne grupe i kod grupe pacijenata. Rezultati su dati u Tabeli 6.

Tabela 6. Inflamatorni parametri za kontrolnu grupu i grupu pacijenata

Parametar#	Kontrolna grupa	Sarkoidoza	P ^a
hsCRP (mg/L)	1,13 (0,96-1,33)	1,62 (1,30-2,00)	<0,05
ACE (U/L)	/	49,7 (43,5-53,3)	/

Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti

^a Studentov t-test

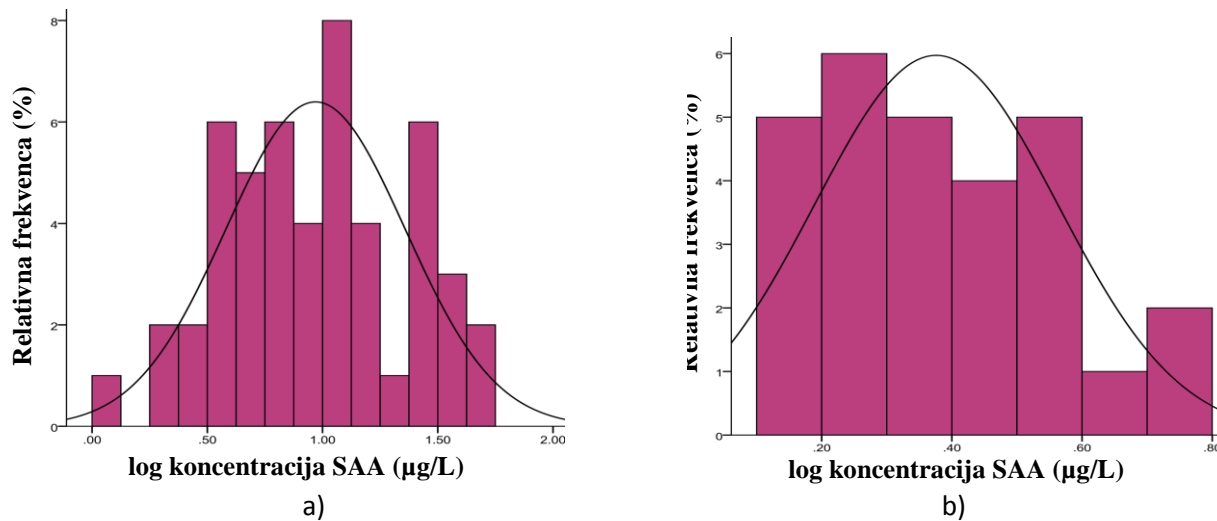
Koncentracije hsCRP-a su značajno veće kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom, a aktivnost ACE je blizu gornje granice referentnog intervala koji je definisan u našoj populaciji (8-52 U/L).

Pošto je inflamacija izražena preko SAA naročito značajna za sarkoidozu, za ovaj parametar dati su i osnovni statistički podaci i raspodela kod kontrolne grupe i grupe pacijenata. Podaci su predstavljeni u Tabeli 7, dok su histogrami raspodele ovog parametra u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata dati na Slici 8. Grafički prikaz SAA kod kontrolne grupe i pacijenata dat je na Slici 9. Vrednosti SAA slede normalnu raspodelu nakon logaritamske transformacije, pa su prikazane kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti.

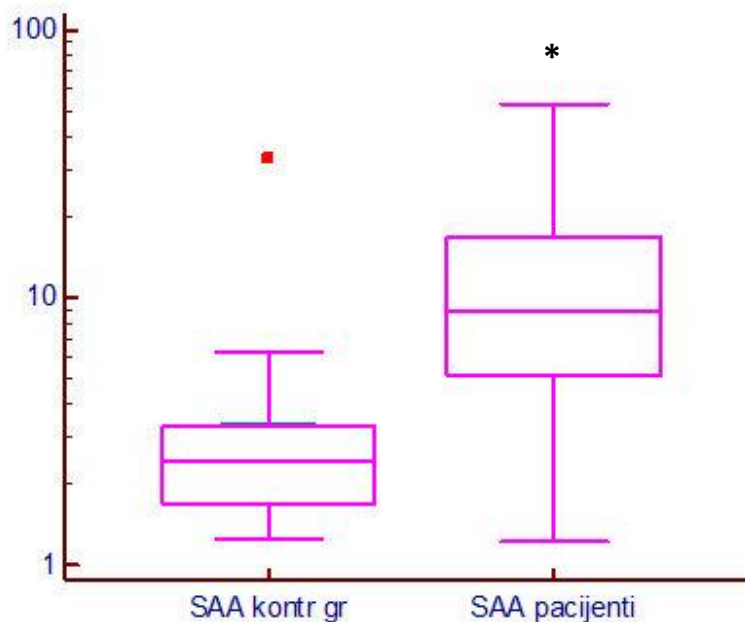
Tabela 7. Osnovni statistički podaci za SAA ($\mu\text{g/L}$) u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata

	Kontrolna grupa	Sarkoidoza
Geometrijska srednja vrednost	2,60	9,32*
95% interval pouzdanosti	2,03-3,33	7,22-12,03
Standardna devijacija	-	-
Medijana	2,45	8,89
Interkvartilni raspon	1,71-3,27	5,06-16,94
Koef asimetrije	2,30 (P<0,0001)	0,024 (P=0,940)
Koef zaobljenosti	8,14 (P=0,0002)	-0,664 (P=0,271)
Kolmogorov- Smirnov test	P=0,346	P=0,814

*P<0,001; sarkoidoza prema kontrolnoj grupi (Studentov t-test)



Slika 8. Raspodela SAA u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata (a-kontrolna grupa; b-grupa pacijenata)



Slika 9. Grafički prikaz srednjih vrednosti SAA kod kontrolne grupe i grupe pacijenata

* $P < 0,001$

(parametar sledi log-normalnu raspodelu i podaci su prikazani kao geometrijske srednje vrednosti i 95% interval pouzdanosti)

4.3. Oksidativno-stresni status kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom u serumu i eritrocitima

Pre nego što je testirana razlika u parametrima oksidativno-stresnog statusa između kontrolne grupe i pacijenata, za svaki parametar u obe grupe ispitanika su određeni osnovni statistički parametri, kao i parametri koji opisuju oblik distribucije.

Osim u serumu, bilo je značajno da se parametri oksidativno-stresnog statusa odrede i u eritrocitima pacijenata i kontrolne grupe. U tu svrhu, korišćeni su hemolizati eritrocita.

4.3.1. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu kontrolne grupe

Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u serumu kontrolne grupe su prikazani u Tabeli 8. Korišćenjem Kolmogorov-Smirnov testa, utvrđeno je da koncentracije TAS-a, TOS-a, PAB-a i SH grupa slede normalnu raspodelu i ovi parametri su prikazani kao aritmetička srednja vrednost i standardna devijacija. Koncentracija MDA nije sledila normalnu već log-normalnu raspodelu i podaci su predstavljeni kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti. Raspodela aktivnosti SOD nije imala normalan tok ni nakon logaritamske transformacije, pa su podaci prikazani kao medijana i interkvartilni raspon.

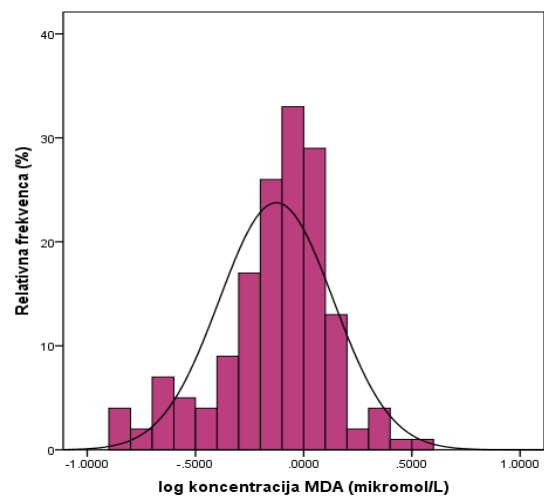
Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u serumu kontrolne grupe dati su na Slici 10.

Tabela 8. Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u serumu kontrolne grupe

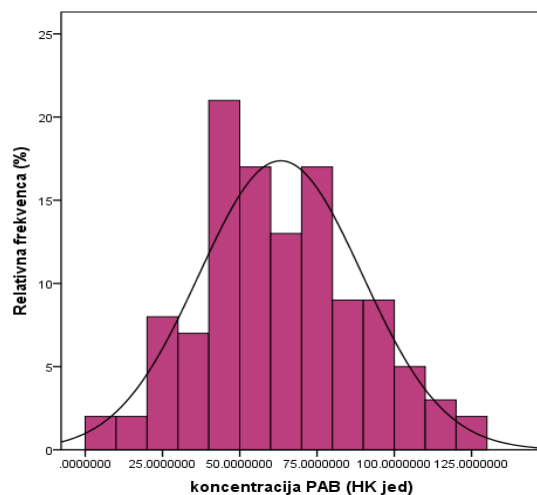
	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TOS ($\mu\text{mol/L}$)	PAB (HK jed)	TAS ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/L)	SH grupe (mmol/L)
Srednja vrednost	0,740*	4,33	63,23	1126	-	0,514
95% interval pouzdanosti	0,671-0,815	3,83-4,88	58,36-68,11	1096-1157	-	0,499-0,530
Stand devijacija	-	2,32	36,40	119,1	-	0,109
Medijana	0,820	-	-	-	96,0	-
Interkvartilni raspon	0,580-1,150	-	-	-	37,0-125,0	-
Koef asimetrije	-0,74 (P=0,0004)	1,93 (P<0,0001)	0,23 (P=0,296)	0,38 (P=0,211)	-0,65 (P=0,001)	0,55 (P=0,002)
Koef zaobljenosti	0,64 (P=0,127)	7,03 (P<0,0001)	-0,32 (P=0,485)	-0,089 (P=0,959)	-0,84 (P=0,0003)	0,67 (P=0,086)
Kolmogorov-Smirnov test	P=0,052	P=0,077	P=0,503	P=0,949	P=0,0003	P=0,218

Podaci za srednju vrednost se odnose na aritmetičku srednju vrednost (ako nije drugačije naznačeno)

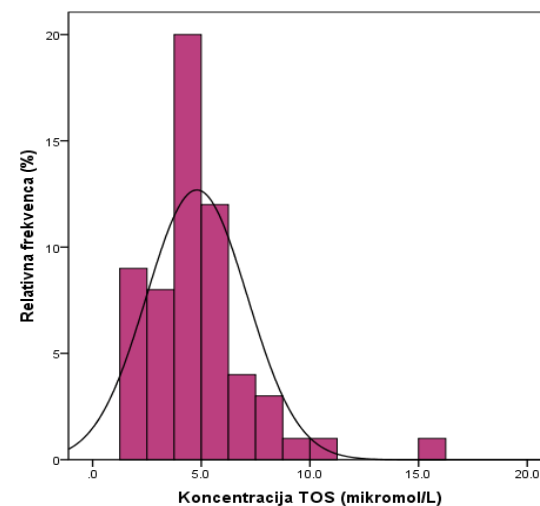
*Geometrijska srednja vrednost



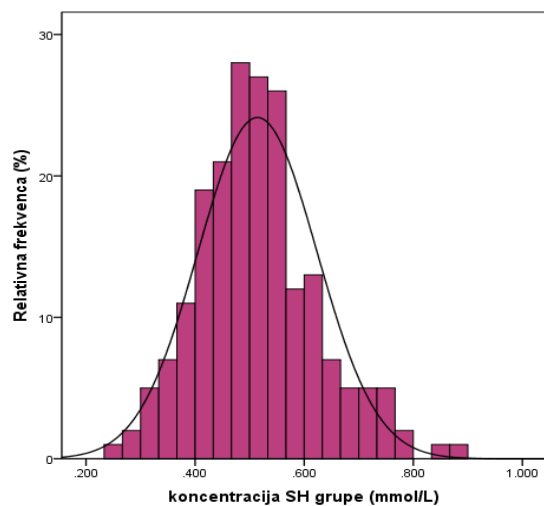
a)



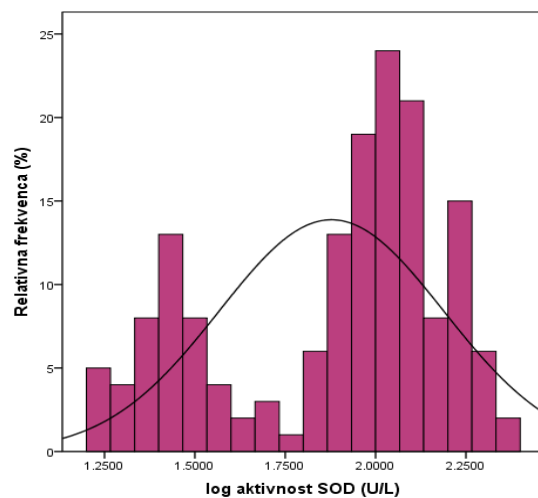
b)



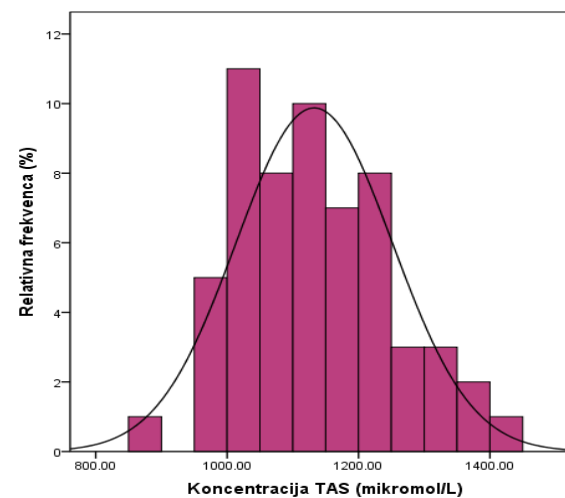
c)



d)



e)



f)

Slika 10. Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u serumu kontrolne grupe (a – log konc MDA, b – konc PAB, c – konc TOS, d – konc SH gr, e – log akt SOD, f – konc TAS)

4.3.2. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu pacijenata

Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u serumu pacijenata su prikazani u Tabeli 9. Primenom Kolmogorov-Smirnov testa, utvrđeno je da koncentracije PAB-a i SH grupa slede normalnu raspodelu i ovi parametri su prikazani kao aritmetička srednja vrednost i standardna devijacija. Koncentracije MDA, TOS-a, TAS-a, kao i aktivnost SOD-a nije sledila normalnu već log-normalnu raspodelu i podaci su predstavljeni kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti.

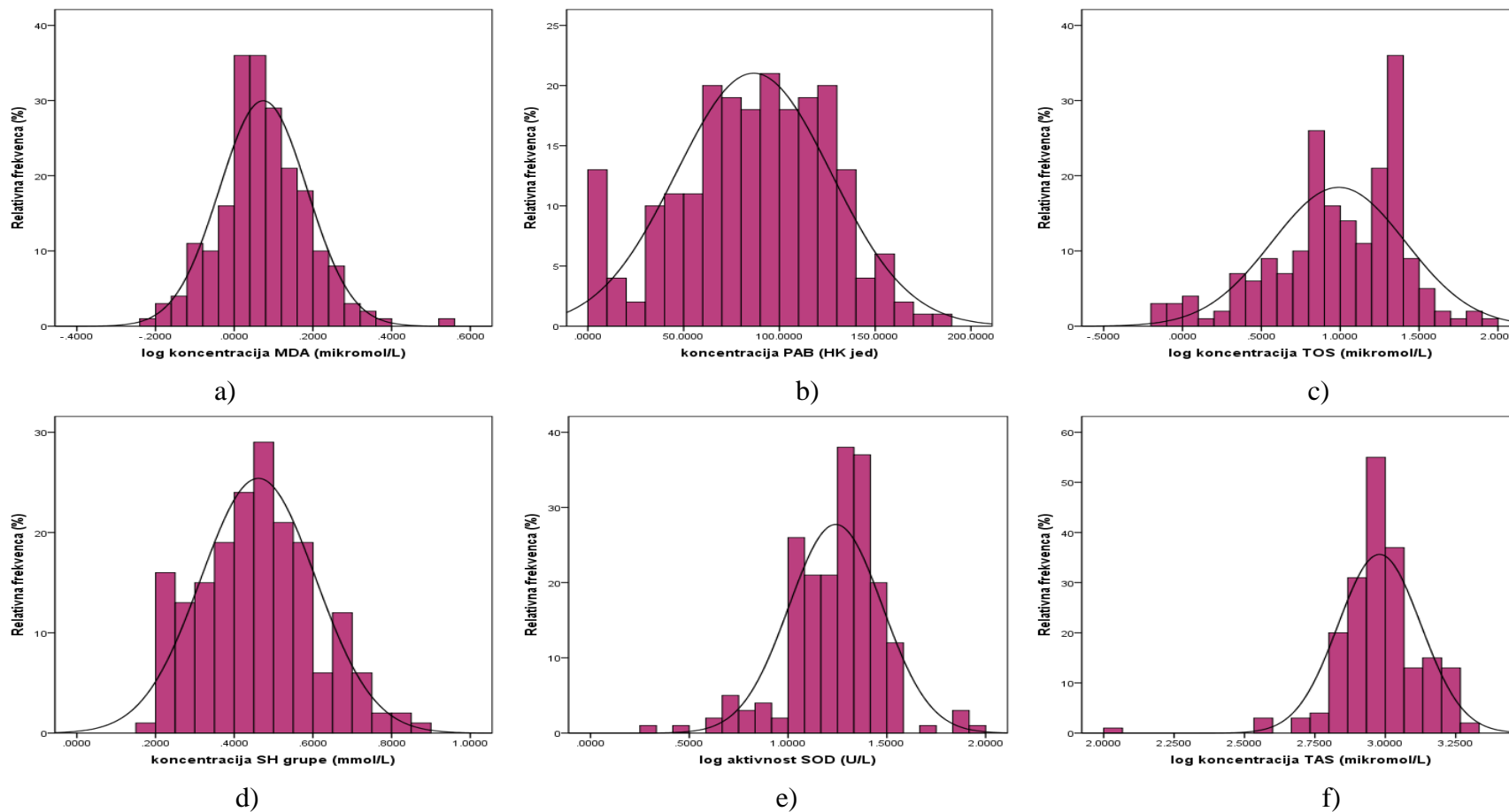
Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u serumu pacijenata dati su na Slici 11.

Tabela 9. Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u serumu pacijenata

	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	TOS ($\mu\text{mol/L}$)	PAB (HK jed)	TAS ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (U/L)	SH grupe (mmol/L)
Srednja vrednost	1,18*	9,77*	86,5	954*	17,43*	0,461
95% interval pouzdanosti	1,14-1,23	8,52-11,22	84,3-94,7	909-1000	16,14-18,81	0,440-0,482
Stand devijacija	-	-	40,4	-	-	0,146
Medijana	1,17	10,95	-	949	18,00	-
Interkvartilni raspon	1,02-1,40	5,85-21,45	-	810-1106	13,00-24,00	-
Koef asimetrije	0,33 (P=0,047)	-0,66 (P=0,0003)	-0,16 (P=0,341)	-1,34 (P<0,0001)	-0,61 (P=0,0007)	0,31 (P=0,083)
Koef zaobljenosti	1,02 (P=0,018)	0,20 (P=0,487)	-0,39 (P=0,196)	7,75 (P<0,0001)	1,98 (P=0,0005)	-0,38 (P=0,233)
Kolmogorov-Smirnov test	P=0,305	P=0,076	P=0,853	P=0,085	P=0,080	P=0,705

Podaci za srednju vrednost se odnose na aritmetičku srednju vrednost (ako nije drugačije naznačeno)

*Geometrijska srednja vrednost



Slika 11. Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u serumu pacijenata (a – log konc MDA, b – konc PAB, c – log konc TOS, d – konc SH gr, e – log akt SOD, f – log konc TAS)

4.3.3. Poređenje serumskih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između kontrolne grupe i grupe pacijenata

U Tabeli 10 i na Slici 12 prikazani su parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kontrolne grupe i pacijenata. Kako su podaci za koncentracije PAB-a i SH grupa normalno distribuirani i kod kontrolne grupe i kod pacijenata, poređenje među njima je izvršeno Studentovim t-testom. Koncentracije parametara MDA, TOS i TAS kod pacijenata slede normalnu raspodelu nakon logaritamske transformacije, pa je poređenje urađeno Studentovim t-testom sa logaritmovanim vrednostima (iako TOS i TAS imaju normalnu raspodelu kod kontrolne grupe). Kako aktivnost SOD sledi logaritamsku normalnu raspodelu kod pacijenata, a kod kontrolne grupe ni posle logaritmovanja vrednosti, razlika među grupama je testirana Mann-Whitney testom.

Očekivano, parametri MDA, TOS i PAB su bili značajno viši dok su TAS, SOD i SH grupe bili značajno niži kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 10. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu kontrolne grupe i grupe pacijenata

Parametar	Kontrolna grupa	Sarkoidoza	P ^a
MDA (μmol/L)	0,74 (0,67-0,81)	1,18 (1,14-1,23)	<0,0001
TOS (μmol/L)	4,33 (3,83-4,88)	9,77 (8,52-11,22)	<0,0001
PAB (HK jed) #	63,23 ± 36,40	86,55 ± 40,42	<0,0001
TAS (μmol/L)	1126 (1096-1157)	954 (909-1000)	<0,0001
SOD (U/L) ¥	96,0 (37,0-125,0)	18,0 (13,0-24,0)	<0,0001 ^b
SH grupe (mmol/L) #	0,514 ± 0,109	0,461 ± 0,146	<0,001

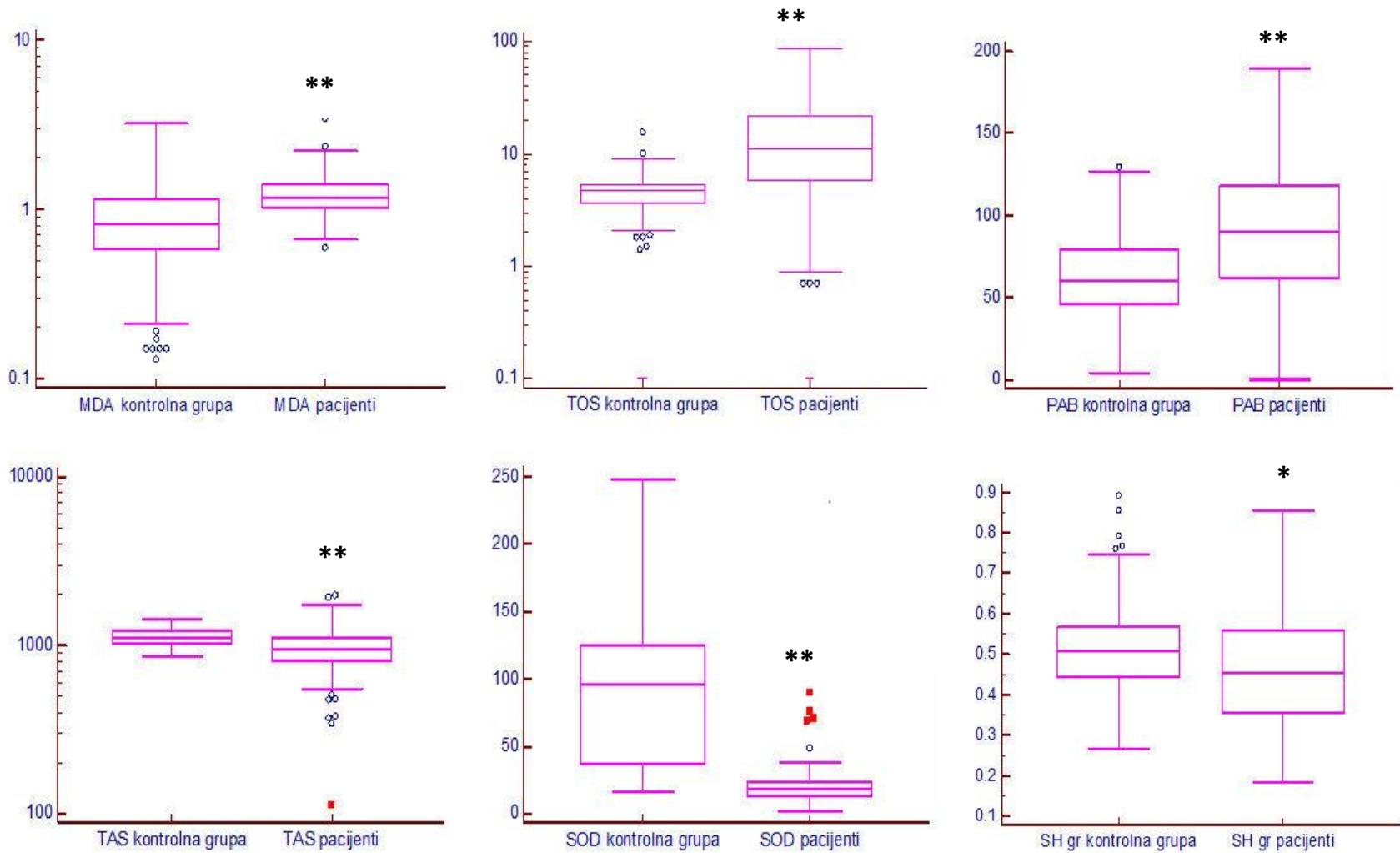
Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti (ako nije drugačije naznačeno)

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija

¥ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon

^a Studentov t-test (ako nije drugačije naznačeno)

^b MannWhitney test



Slika 12. Grafički prikaz srednjih vrednosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu kontrolne grupe i grupe pacijenata * $P < 0,001$; ** $P < 0,0001$ (kod parametara koji slede normalnu raspodelu (PAB i SH gr), podaci su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije; kod parametara koji slede log-normalnu raspodelu (MDA, TOS i TAS), podaci su prikazani kao geometrijske srednje vrednosti i 95% interval pouzdanosti; kod parametara koji nemaju normalnu raspodelu (SOD), podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon)

4.3.4. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u eritrocitima kontrolne grupe

Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u hemolizatima eritrocita kontrolne grupe su predstavljeni u Tabeli 11. Kolmogorov-Smirnov test je pokazao da koncentracije MDA i aktivnost SOD slede normalnu raspodelu, pa su podaci prikazani kao aritmetička srednja vrednost i standardna devijacija. Koncentracije TOS-a, SH grupa i O_2^- imaju log-normalnu raspodelu i podaci su dati kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti.

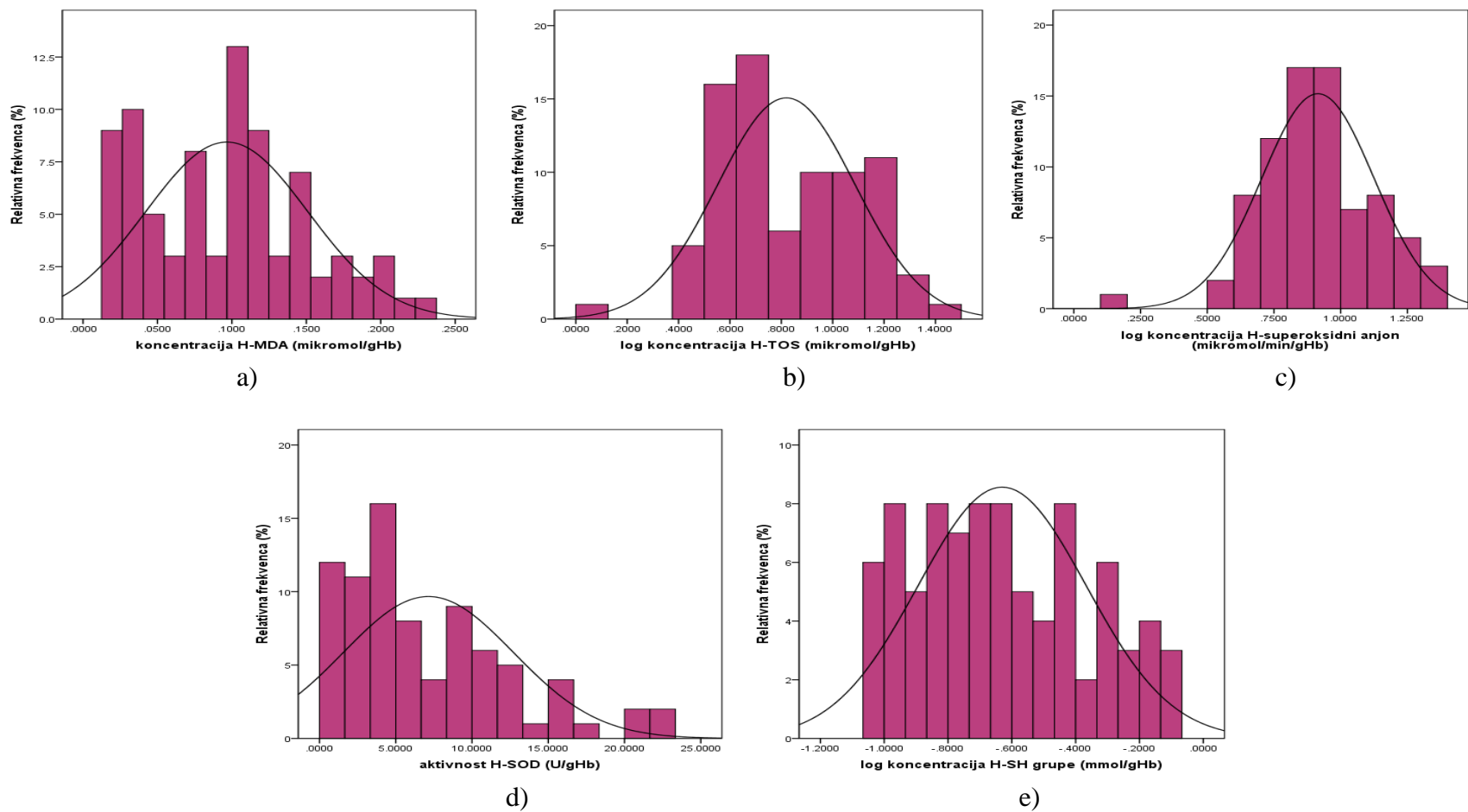
Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u hemolizatima eritrocita kontrolne grupe dati su na Slici 13.

Tabela 11. Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u hemolizatima eritrocita kontrolne grupe

	MDA ($\mu\text{mol/gHb}$)	TOS ($\mu\text{mol/gHb}$)	O_2^- ($\mu\text{mol/min/gHb}$)	SOD (U/gHb)	SH grupe (mmol/gHb)
Srednja vrednost	0,097	6,60*	8,22*	7,14	0,234*
95% interval pouzdanosti	0,085-0,109	5,76-7,57	7,38-9,15	5,91-8,37	0,205-0,267
Stand devijacija	0,055	-	-	5,57	-
Medijana	-	5,96	8,01	-	0,220
Interkvartilni raspon	-	4,04-10,76	5,96-11,45	-	0,140-0,350
Koef asimetrije	0,39 (P=0,136)	0,16 (P=0,541)	-0,12 (P=0,649)	0,99 (P=0,0008)	0,30 (P=0,239)
Koef zaobljenosti	-0,57 (P=0,194)	-0,59 (P=0,174)	1,03 (P=0,090)	0,46 (P=0,323)	-0,95 (P=0,002)
Kolmogorov-Smirnov test	P=0,394	P=0,156	P=0,695	P=0,085	P=0,677

Podaci za srednju vrednost se odnose na aritmetičku srednju vrednost (ako nije drugačije naznačeno)

*Geometrijska srednja vrednost



Slika 13. Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u hemolizatima eritrocita kontrolne grupe (H = hemolizat) (a – konc MDA, b – log konc TOS, c – log konc O_2^- , d – akt SOD, e – log konc SH gr)

4.3.5. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u eritrocitima pacijenata

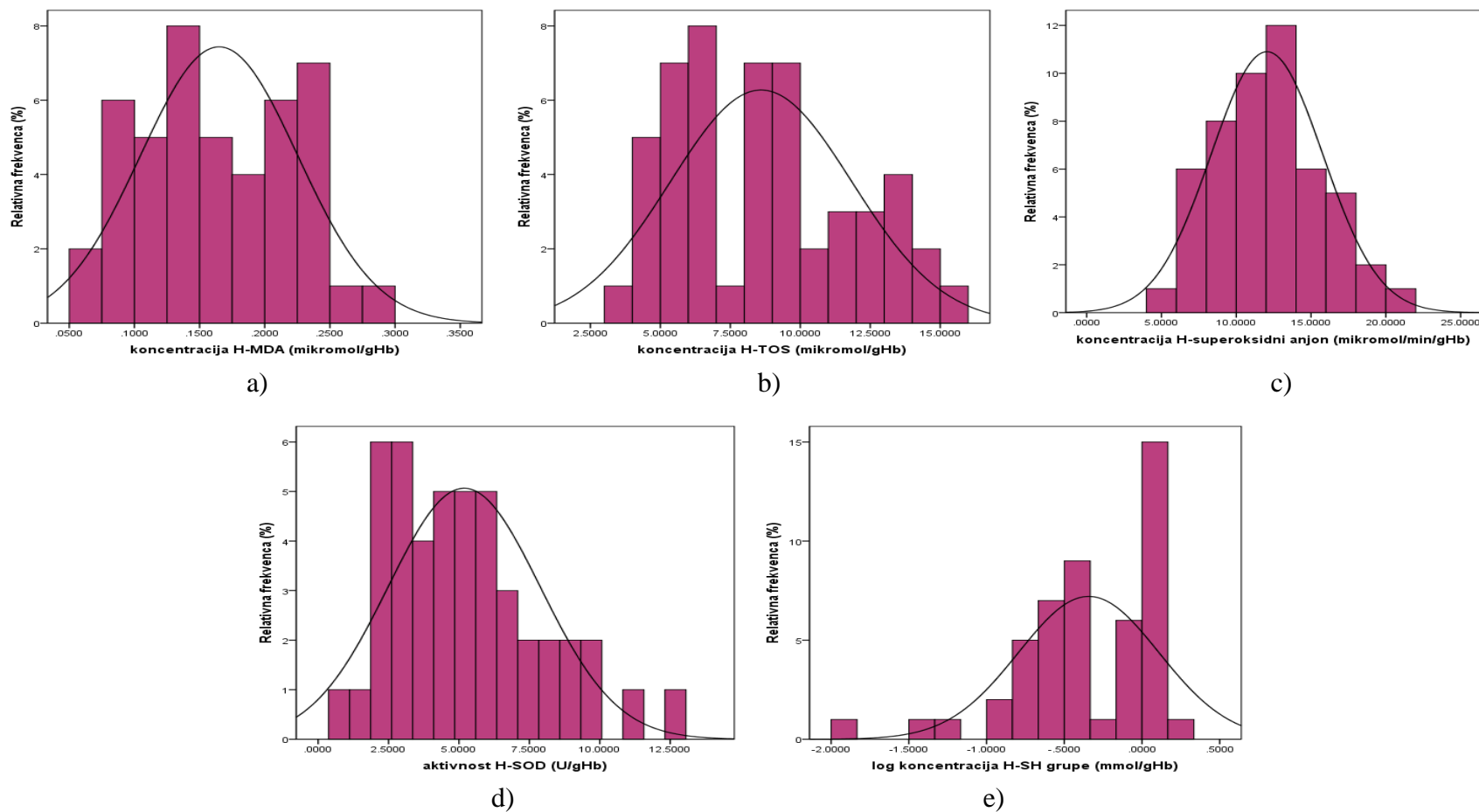
Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u hemolizatima eritrocita grupe pacijenata su prikazani u Tabeli 12. Primenom Kolmogorov-Smirnov testa, utvrđeno je da koncentracije MDA, TOS-a, O_2^- i aktivnost SOD-a prate normalnu raspodelu, pa su njihovi podaci izraženi kao aritmetička srednja vrednost i standardna devijacija. Koncentracija SH grupa ne pokazuje normalnu distribuciju ni nakon logaritamske transformacije i podaci su dati kao medijana i interkvartilni raspon.

Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u hemolizatima eritrocita pacijenata dati su na Slici 14.

Tabela 12. Osnovni statistički podaci za parametre oksidativno-stresnog statusa u hemolizatima eritrocita pacijenata

	MDA ($\mu\text{mol/gHb}$)	TOS ($\mu\text{mol/gHb}$)	O_2^- ($\mu\text{mol/min/gHb}$)	SOD (U/gHb)	SH grupe (mmol/gHb)
Srednja vrednost	0,165	7,99	11,47	5,18	-
95% interval pouzdanosti	0,147-0,183	7,15-8,93	10,48-12,56	4,38-5,99	-
Stand devijacija	0,060	3,24	3,73	2,70	-
Medijana	-	-	-	-	0,461
Interkvartilni raspon	-	-	-	-	0,242-1,111
Koef asimetrije	0,07 (P=0,836)	0,39 (P=0,232)	0,38 (P=0,242)	0,66 (P=0,059)	-1,26 (P=0,001)
Koef zaobljenosti	-1,03 (P=0,018)	-0,88 (P=0,050)	-0,38 (P=0,613)	0,02 (P=0,800)	2,05 (P=0,027)
Kolmogorov-Smirnov test	P=0,901	P=0,457	P=0,764	P=0,860	P=0,040

Podaci za srednju vrednost se odnose na aritmetičku srednju vrednost



Slika 14. Histogrami raspodele parametara oksidativno-stresnog statusa u hemolizata eritrocita pacijenata (H = hemolizat) (a – konc MDA, b–konc TOS, c –konc O_2^- , d – akt SOD, e – log konc SH gr)

4.3.6. Poređenje eritrocitnih parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite između kontrolne grupe i grupe pacijenata

Eritrocitni parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kontrolne grupe i pacijenata prikazani su u Tabeli 13 i na Slici 15.

Kako su podaci za koncentracije MDA i aktivnost SOD normalno distribuirani i kod kontrolne grupe i kod pacijenata, poređenje među njima je izvršeno Studentovim t-testom. Koncentracije parametara TOS i O_2^- u kontrolnoj grupi slede normalnu raspodelu nakon logaritamske transformacije, pa je poređenje urađeno Studentovim t-testom sa logaritmovanim vrednostima (iako TOS i O_2^- imaju normalnu raspodelu u grupi pacijenata). Poštokoncentracija SH grupa sledi logaritamsku normalnu raspodelu kod kontrolne grupe, a u grupi pacijenata ni posle logaritmovanja vrednosti, razlika među njima je testirana Mann-Whitney testom.

Parametri MDA, TOS i O_2^- su bili značajno viši, a SOD je bio značajno niži kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, koncentracija SH grupa je bila značajno viša kod pacijenata.

Tabela 13. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u hemolizatima eritrocita kontrolne grupe i grupe pacijenata

Parametar	Kontrolna grupa	Sarkoidoza	P ^a
MDA ($\mu\text{mol/gHb}$)	0,097 \pm 0,055	0,165 \pm 0,060	<0,0001
TOS ($\mu\text{mol/gHb}$) #	6,60 (5,76-7,57)	7,99 (7,15-8,93)	<0,05
O_2^- ($\mu\text{mol/min/gHb}$) #	8,22 (7,38-9,15)	11,47 (10,48-12,56)	<0,0001
SOD (U/gHb)	7,14 \pm 5,57	5,18 \pm 2,70	<0,01
SH grupe (mmol/gHb) ¥	0,220 (0,140-0,350)	0,461 (0,242-1,111)	<0,0001^b

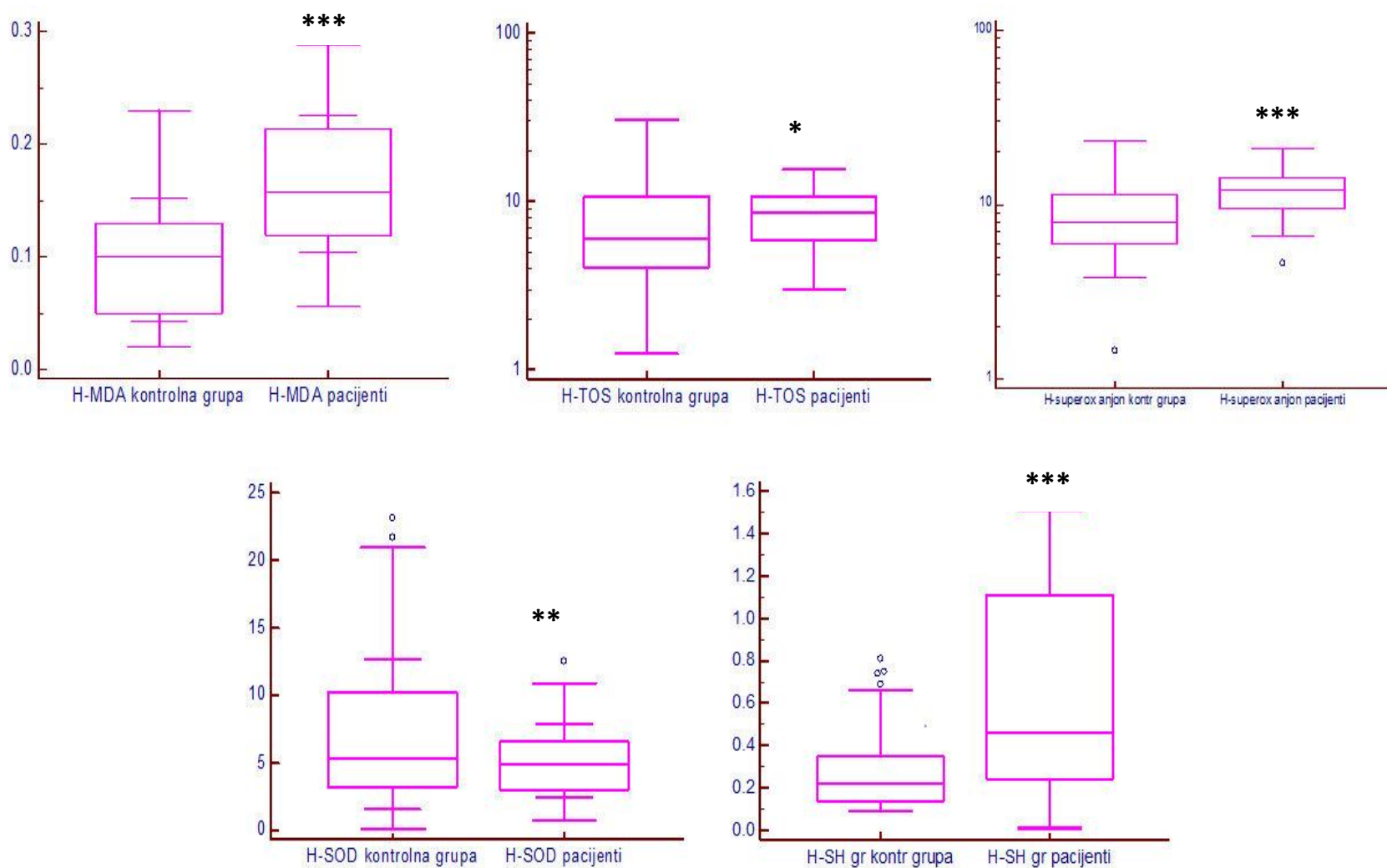
Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (ako nije drugačije naznačeno)

Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti

¥ Podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon

^a Studentov t-test (ako nije drugačije naznačeno)

^b MannWhitney test



Slika 15. Grafički prikaz srednjih vrednosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u eritrocitima kontrolne grupe i grupe pacijenata (H=hemolizat) (kod parametara koji slede normalnu raspodelu (MDA i SOD), podaci su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije; kod parametara koji slede log-normalnu raspodelu (TOS i O_2^-), podaci su prikazani kao geometrijske srednje vrednosti i 95% interval pouzdanosti; kod parametara koji nemaju normalnu raspodelu (SH grupe), podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon)

4.3.7. Korelacije serumskih i eritrocitnih parametara oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata

Da bi se procenilo da li postoji povezanost između parametara oksidativno-stresnog statusa i inflamatornih i lipidnih parametara, korišćena je Spearmanova korelaciona analiza.

Rezultati ove analize prikazani su u Tabeli 14.

Tabela 14. Spearmanova korelaciona analiza serumskih i eritrocitnih parametara oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima u kontrolnoj grupi

Parametar	UH (mmol/L)	HDL-H (mmol/L)	LDL-H (mmol/L)	TG (mmol/L)	hsCRP (mg/L)	SAA (μ g/L)
S-MDA (μ mol/L)	0,120	0,033	0,096	0,235**	-0,126	-0,186
S-TOS (μ mol/L)	0,157	-0,182	0,144	0,105*	-0,093	-0,133
S-PAB (HK jed)	0,039	0,180	0,000	-0,069	0,175*	0,101
S-TAS (μ mol/L)	0,017	-0,059	0,010	0,185	-0,105	-0,017
S-SH grupe (mmol/L)	0,040	0,020	-0,037	0,365***	-0,100	-0,146
S-SOD (U/L)	-0,084	0,321***	-0,166*	-0,010	-0,093	0,024
H-TOS (μ mol/gHb)	-0,027	0,077	0,032	-0,207	0,085	0,090
H-O ₂ ⁻ (μ mol/min/gHb)	0,001	0,137	0,061	-0,242	0,027	0,123
H-MDA (μ mol/gHb)	0,012	0,080	0,073	-0,235	0,110	0,067
H-SOD (U/gHb)	-0,039	0,113	0,052	-0,353	-0,012	-0,035
H-SH grupe (mmol/gHb)	-0,003	0,093	0,058	-0,214	0,023	-0,015

S-serum, H- hemolizat eritrocita; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

U kontrolnoj grupi, dobijeno je nekoliko značajnih korelacija. Za serum, SH grupe se nalaze u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom TG, aktivnost SOD sa koncentracijom HDL-H, MDA i TOS sa TG, a PAB sa hsCRP-om. Utvrđena je i negativna korelacija između aktivnosti

SOD i LDL-H. Nisu uočene značajne korelacije eritrocitnih parametara oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima.

U grupi pacijenata, uočeno je više značajnih korelacija u odnosu na kontrolnu grupu što ukazuje na jaču međusobnu povezanost ovih parametara u bolesti. Rezultati korelacione analize su dati u Tabeli 15.

Tabela 15. Spearmanova korelaciona analiza serumskih i eritrocitnih parametara oksidativno-stresnog statusa sa inflamatornim i lipidnim parametrima u grupi pacijenata

Parametar	UH (mmol/L)	HDL-H (mmol/L)	LDL-H (mmol/L)	TG (mmol/L)	ACE (U/L)	hsCRP (mg/L)	SAA (µg/L)
S-MDA (µmol/L)	-0,015	-0,257*	0,029	0,075	0,241*	0,251*	0,214
S-TOS (µmol/L)	-0,006	-0,134	-0,088	0,238**	0,256*	-0,081	-0,061
S-PAB (HK jed)	0,018	-0,015	0,153	-0,046	0,243**	0,361***	0,193
S-TAS (µmol/L)	-0,160*	0,194*	-0,114	-0,248**	0,101	0,251*	0,032
S-SH grupe (mmol/L)	0,047	-0,032	-0,033	0,282***	-0,046	-0,075	-0,187
S-SOD (U/L)	0,180*	0,150	0,194*	0,083	-0,072	-0,024	-0,055
H-TOS (µmol/gHb)	0,206	0,023	0,480**	-0,095	-0,011	-0,126	0,527
H-O ₂ ⁻ (µmol/min/gHb)	0,111	-0,078	0,393*	-0,084	0,056	-0,131	0,532
H-MDA (µmol/gHb)	0,249	0,209	0,396*	-0,139	0,131*	-0,018	0,409
H-SOD (U/gHb)	0,272	-0,269	0,367	0,204	-0,005	0,000	0,292
H-SH grupe (mmol/gHb)	0,100	0,351*	0,206	-0,214	-0,049	-0,075	0,185

S-serum, H- hemolizat eritrocita; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Za serumske parametre utvrdili smo da su TOS i SH grupe u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom TG; zatim da je SOD u korelaciji sa koncentracijom UH i LDL-H; MDA i PAB sa hsCRP-om, a PAB sa aktivnošću ACE. Značajne negativne korelacije su uočene između

MDA i koncentracije HDL-H, kao i koncentracije TAS-a sa UH, HDL-H, TG i hsCRP-om. Za eritrocitne parametre, značajna pozitivna korelacija je dobijena između TOS-a i LDL-H, SH grupa i HDL-H, O_2^- i LDL-H, kao i između MDA i LDL-H.

4.3.8. Binarna logistička regresiona analiza postojanja veze između nivoa parametara oksidativno-stresnog statusa i sarkoidoze

Kako su se parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite značajno razlikovali između pacijenata sa sarkoidozom i kontrolne grupe, proverili smo da li neki od serumskih i/ili eritrocitnih parametara oksidativnog stresa i/ili antioksidativne zaštite ima sposobnost da predvidi prisustvo bolesti. U tu svrhu, korišćena je metoda binarne logističke regresije. Prvo su univarijantnom analizom određene nekorigovane odds ratio (OR) vrednosti i 95% interval pouzdanosti. Rezultati univarijantne analize su predstavljeni u Tabeli 16.

Tabela 16. Pojedinačne nekorigovane OR vrednosti za serumske i eritrocitne parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Parametar	OR	95% CI	P
S-MDA ($\mu\text{mol/L}$)	11,729	5,880-23,396	<0,001
S-TOS ($\mu\text{mol/L}$)	1,258	1,152-1,372	<0,001
S-PAB (HK jed)	1,018	1,011-1,025	<0,001
S-TAS ($\mu\text{mol/L}$)	0,998	0,997-0,999	<0,01
S-SOD (U/L)	0,920	0,899-0,941	<0,001
S-SH gr (mmol/L)	0,039	0,008-0,200	<0,001
H-MDA ($\mu\text{mol/gHb}$)	1,219	1,128-1,318	<0,001
H-TOS ($\mu\text{mol/gHb}$)	1,030	0,954-1,112	0,449
H- O_2^- ($\mu\text{mol/min/gHb}$)	1,157	1,062-1,260	<0,01
H-SOD (U/gHb)	0,907	0,829-0,992	<0,05
H-SH gr (mmol/gHb)	1,183	1,024-1,289	<0,001

S-serum; H- hemolizat eritrocita

Rezultati pokazuju da prediktivni značaj na postojanje bolesti imaju i serumski i eritrocitni parametri oksidativno-stresnog statusa. Ipak, serumski MDA (među serumskim parametrima oksidativno-stresnog statusa) i eritrocitni MDA (među eritrocitnim parametrima oksidativno-stresnog statusa) su se izdvojili kao parametri sa najvećom sposobnošću da predvide prisustvo sarkoidoze. Među eritrocitnim parametrima, samo TOS nije imao prediktivni značaj.

Kako su parametri oksidativno-stresnog statusa u univarijantnoj analizi pokazali značajnu prediktivnu sposobnost, dalje je korišćena multivarijantna analiza u kojoj su rađeni podešavanje (korekcija) (engl. *adjustment*) vrednosti S-MDA i H-MDA za serumske odnosno eritrocitne parametre, kao i za lipidne parametre. Ovi rezultati su dati u Tabeli 17. OR za serumski MDA se spustio na vrednost 3,762 kad je modifikovan za parametre oksidativno-stresnog statusa i na vrednost 3,915 za parametre lipidnog statusa u odnosu na univarijantnu analizu, ali je i dalje bio značajno povezan sa razvojem bolesti. H-MDA je takođe zadržao prediktivni uticaj na razvoj bolesti, ali njegova promena nije tako izražena kao za S-MDA.

Tabela 17. Multivarijantna binarna logistička regresija za procenu prediktivnog uticaja serumskog i eritrocitnog MDA na razvoj sarkoidoze

Parametar	Model 1 analiza	Model 2 analiza
	OR (95% CI)	OR (95% CI)
S-MDA	3,762 ¹ (2,082-6,799)*	3,915 (1,809-8,476)*
H-MDA	2,117 ² (1,469-3,052)**	1,319 (1,073-1,621)*

*P<0,01; **P<0,001 S-MDA – serumski MDA; H-MDA- eritrocitni MDA

Zavisna varijabla je bila status bolesti: sarkoidoza (1) u poređenju sa kontrolom (0)

Model 1:

1 korekcija za serumske parametre oksidativno-stresnog statusa

2 korekcija za eritrocitne parametre oksidativno-stresnog statusa

Model 2

korekcija za parametre lipidnog statusa

4.3.9. Analiza Receiver Operating Characteristic (ROC) krivih za parametre serumskog i eritrocitnog oksidativno-stresnog statusa i lipidnog statusa

Da bi se proverila dijagnostička tačnost parametara oksidativno-stresnog i lipidnog statusa u razlikovanju pacijenata sa sarkoidozom od zdravih ispitanika, urađena je analiza ROC krivih. Primenom Hosmer-Lemeshow pravila, potencijal samih parametara, kao i primenjenih modela u

razdvajanju pacijenata od kontrolne grupe može biti definisan kao slab ($0,5 \leq \text{AUC} < 0,7$), prihvatljiv ($0,7 \leq \text{AUC} < 0,8$), odličan ($0,8 \leq \text{AUC} < 0,9$) i izvanredan ($\text{AUC} \geq 0,9$) (123). Rezultati su dati u Tabelama 18 i 19. Grafički prikaz modela koji sadrže serumske oksidanse i antioksidanse dat je na Slici 16.

Tabela 18. Analiza ROC krivih za pojedinačne parametre serumskog i eritrocitnog oksidativno-stresnog statusa i lipidnog statusa u razlikovanju pacijenata sa sarkoidozom od kontrolne grupe

Parametar	AUC	95% CI	Stand greška	P
S-MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0,995	0,988-1,000	0,003	<0,001
S-TOS ($\mu\text{mol/L}$)	0,810	0,747-0,872	0,032	<0,001
S-PAB (HK jed)	0,627	0,540-0,714	0,044	<0,05
S-TAS ($\mu\text{mol/L}$)	0,717	0,652-0,782	0,033	<0,001
S-SOD (U/L)	0,600	0,461-0,739	0,071	0,118
S-SH gr (mmol/L)	0,584	0,511-0,657	0,037	0,071
H-MDA ($\mu\text{mol/gHb}$)	0,788	0,706-0,870	0,042	<0,001
H-TOS ($\mu\text{mol/gHb}$)	0,652	0,554-0,750	0,050	<0,01
H-O ₂ ⁻ ($\mu\text{mol/min/gHb}$)	0,720	0,627-0,813	0,047	<0,001
H-SOD (U/gHb)	0,428	0,329-0,527	0,050	0,186
H-SH gr (mmol/gHb)	0,712	0,610-0,813	0,052	<0,001
UH (mmol/L)	0,684	0,625-0,743	0,030	<0,001
LDL-H (mmol/L)	0,625	0,563-0,686	0,031	<0,001
HDL-H (mmol/L)	0,571	0,506-0,636	0,033	<0,05
TG (mmol/L)	0,764	0,712-0,815	0,026	<0,001

S-serum; H-hemolizat eritrocita

U pojedinačnoj ROC analizi može da se uoči da, među serumskim parametrima oksidativno-stresnog statusa, S-MDA ima izvanredan potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od kontrolne grupe dok se S-TOS karakteriše odličnim dijagnostičkom tačnošću. Među eritrocitnim parametrima, najveću tačnost u razdvajanju pacijenata od zdravih osoba, poseduje H-MDA i

njega karakteriše prihvatljiva tačnost. Među lipidnim parametrima, izdvajaju se TG koji takođe imaju prihvatljiv nivo dijagnostičke tačnosti.

Tabela 19. Analiza ROC krivih za modele parametara serumskog i eritrocitnog oksidativno-stresnog statusa i lipidnog statusa u razlikovanju pacijenata sasarkoidozom od kontrolne grupe

Model	AUC	95% CI	Stand greška	P
Model 1	0,996	0,991-1,000	0,002	<0,001
Model 2	0,842	0,774-0,909	0,034	<0,001
Model 3	0,993	0,979-1,007	0,007	<0,001
Model 4	0,819	0,746-0,893	0,037	<0,001
Model 5	0,841	0,759-0,923	0,042	<0,001
Model 6	0,966	0,936-0,995	0,015	<0,001
Model 7	0,826	0,782-0,872	0,023	<0,001

Model 1- serumski TAS, SOD, SH gr

Model 2- serumski MDA, PAB i TOS

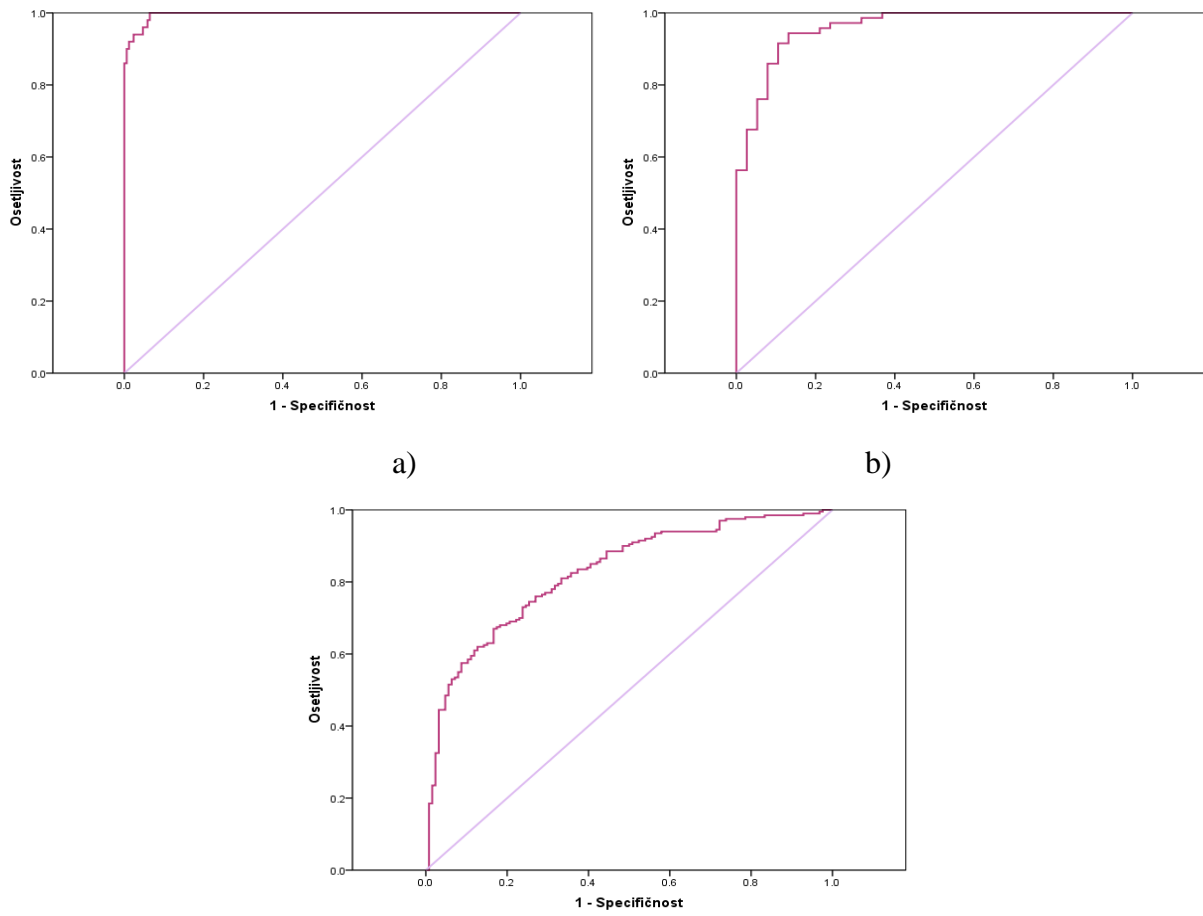
Model 3 –serumski oksidansi i antioksidansi

Model 4 – eritrocitni MDA, TOS i O_2^-

Model 5 – eritrocitni SH gr i SOD

Model 6 – eritrocitni oksidansi i antioksidansi

Model 7 – serumski lipidi (UH, LDL-H, HDL-H, TG)



a)

b)

c)

Slika 16. ROC analiza modela a) serumski oksidansi i antioksidansi, b) eritrocitni oksidansi i antioksidansi, c) serumski lipidi

Analiza ROC krivih za modele je pokazala da izvanrednu dijagnostičku tačnost imaju modeli koji sadrže samo serumske antioksidanase, kombinaciju serumskih oksidanasa i antioksidanasa kao i kombinaciju eritrocitnih oksidanasa i antioksidanasa. Odlična tačnost u razdvajanju pacijenata od zdravih ispitanika je bila uočena kod serumskih i eritrocitnih oksidanasa, eritrocitnih antioksidanasa, kao i kod serumskih lipida. Na osnovu dobijenih rezultata za ROC krive pojedinačnih parametara i modela, može da se zaključi da kombinacije tj. modeli parametara imaju veći potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od kontrolne grupe u odnosu na pojedinačne parametre.

4.4. Raspodela LDL i HDL subfrakcija kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom

Raspodele LDL i HDL čestica određene su kod pacijenata i kontrolne grupe i utvrđeno je da su relativne proporcije LDL I, LDL IVB subfrakcija značajno niže dok su proporcije LDL II, LDL III, LDL IVA, kao i HDL 2a i HDL 3a subfrakcija značajno više kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Dominantni HDL dijametar je bio značajno manji kod pacijenata. Rezultati su dati u Tabeli 20.

Tabela 20. Raspodela LDL i HDL subfrakcija za kontrolnu grupu i grupu pacijenata

Parametar	Kontrolna grupa	Sarkoidoza	P ^a
Dominantni LDL dijametar (nm)	27,05 ± 1,67	21,19 ± 1,07	0,540
LDL subfrakcije (%)			
LDL I	36,9 ± 8,3	22,6 ± 4,9	<0,001
LDL II	12,2 ± 2,9	24,9 ± 3,9	<0,001
LDL III	16,5 ± 4,1	20,4 ± 2,8	<0,001
LDL IV	34,3 ± 8,2	32,2 ± 5,4	0,06
LDL IVA	11,3 ± 2,9	12,6 ± 2,4	<0,01
LDL IVB	23,0 ± 6,3	19,5 ± 5,0	<0,01
Male, guste LDLčestice	50,9 ± 8,3	52,6 ± 6,2	0,159
Dominantni HDL dijametar(nm)	10,43 ± 1,18	9,58 ± 1,14	<0,001
HDL subfrakcije (%)			
HDL 2b	43,2 ± 7,2	41,8 ± 9,3	0,320
HDL 2a	19,4 ± 4,5	21,0 ± 2,5	<0,01
HDL 3a	14,2 ± 3,3	15,8 ± 3,4	<0,01
HDL 3b	9,8 ± 2,9	9,7 ± 3,9	0,310
HDL 3c	12,9 ± 5,7	11,3 ± 6,3	0,110
Male HDL čestice	36,9 ± 8,8	36,8 ± 9,2	0,952

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija

^a Studentov t-test

4.5. PON1 kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom

Aktivnost enzima PON1 određena je prema dva supstrata, paraoksonu (POazna aktivnost) i diazoksonu (DZOazna aktivnost). Određen je i PON1₁₉₂ fenotip na osnovu izračunatog odnosa DZOaza/POaza. Na osnovu odnosa enzimskih aktivnosti, osobe se mogu podeliti u tri fenotipa: QQ, QR i RR fenotip.

4.5.1. Optimizacija metode za određivanje PON1 aktivnosti

Optimizacija metode za određivanje enzimske aktivnosti je rađena sa ciljem da se utvrde optimalni uslovi za delovanje enzima kao i da se utvrdi kada je postignuto najbolje razdvajanje fenotipova. Paraokson i diazokson su rastvarani u puferima različitih koncentracija NaCl i to 1 mol/L, 2 mol/L, 3 mol/L i 4 mol/L. POazne i DZOazne aktivnosti PON1 određene su sa supstratima koji su bili rastvoreni u puferima navedenih koncentracija jer je poznato da je PON1 aktivnost solju-stimulisana, pa tako i koncentracija soli može da utiče. Optimizacija metode je rađena u serumskim uzorcima kontrolne grupe. Raspodela vrednosti odnosa DZOaza/POaza je određena za svaku koncentraciju soli i to: DZOaza 1 mol/L/POaza 1 mol/L; DZOaza 2 mol/L/POaza 2 mol/L; DZOaza 3 mol/L/POaza 3 mol/L; DZOaza 4 mol/L/POaza 4 mol/L; DZOaza 1 mol/L/POaza 2 mol/L; DZOaza 1 mol/L/POaza 3 mol/L; DZOaza 1 mol/L/POaza 4 mol/L; DZOaza 2 mol/L/POaza 1 mol/L; DZOaza 2 mol/L/POaza 3 mol/L; DZOaza 2 mol/L/POaza 4 mol/L; DZOaza 3 mol/L/POaza 1 mol/L; DZOaza 3 mol/L/POaza 2 mol/L; DZOaza 3 mol/L/POaza 4 mol/L; DZOaza 4 mol/L/POaza 1 mol/L; DZOaza 4 mol/L/POaza 2 mol/L; DZOaza 4 mol/L/POaza 3 mol/L. U zavisnosti od primenjene koncentracije NaCl, granične vrednosti za fenotipove su se razlikovale ili nisu mogle ni da se očitaju tj. razdvajanje fenotipova nije bilo odgovarajuće.

U Tabeli 21 dato je poređenje POazne i DZOazne aktivnosti PON1 koje su dobijene sa različitim koncentracijama NaCl. Može se uočiti da sa porastom koncentracije soli, značajno raste i POazna aktivnost. Za DZOaznu aktivnost primećen je značajan porast aktivnosti uz 2 mol/L NaCl u odnosu na 1 mol/L, ali uz veće koncentracije soli uočava se značajno opadanje aktivnosti.

Tabela 21. Poređenje POazne i DZOazne aktivnosti u prisustvu pufera različitih koncentracija soli

Koncentracija soli/ Aktivnost PON1	1 mol/L	2 mol/L	3 mol/L	4 mol/L
POazna akt. (U/L)	292 (244-350)	475 (404-559) ^{a*}	613 (525-715) ^{a,b *}	785 (695-888) ^{a,b,c *}
DZOazna akt. (U/L)	14140 ± 3784	15089 ± 4457 ^{a*}	12699 ± 4205 ^{a,b *}	8534 ± 2978 ^{a,b,c *}

Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti za POaze i kao srednja vrednost ± standardna devijacija za DZOaze

a- Značajno različito u odnosu na aktivnosti dobijene sa 1 mol/L soli

b- Značajno različito u odnosu na aktivnosti dobijene sa 2 mol/L soli

c- Značajno različito u odnosu na aktivnosti dobijene sa 3 mol/L soli

*P<0,0001 Anova za ponovljena merenja

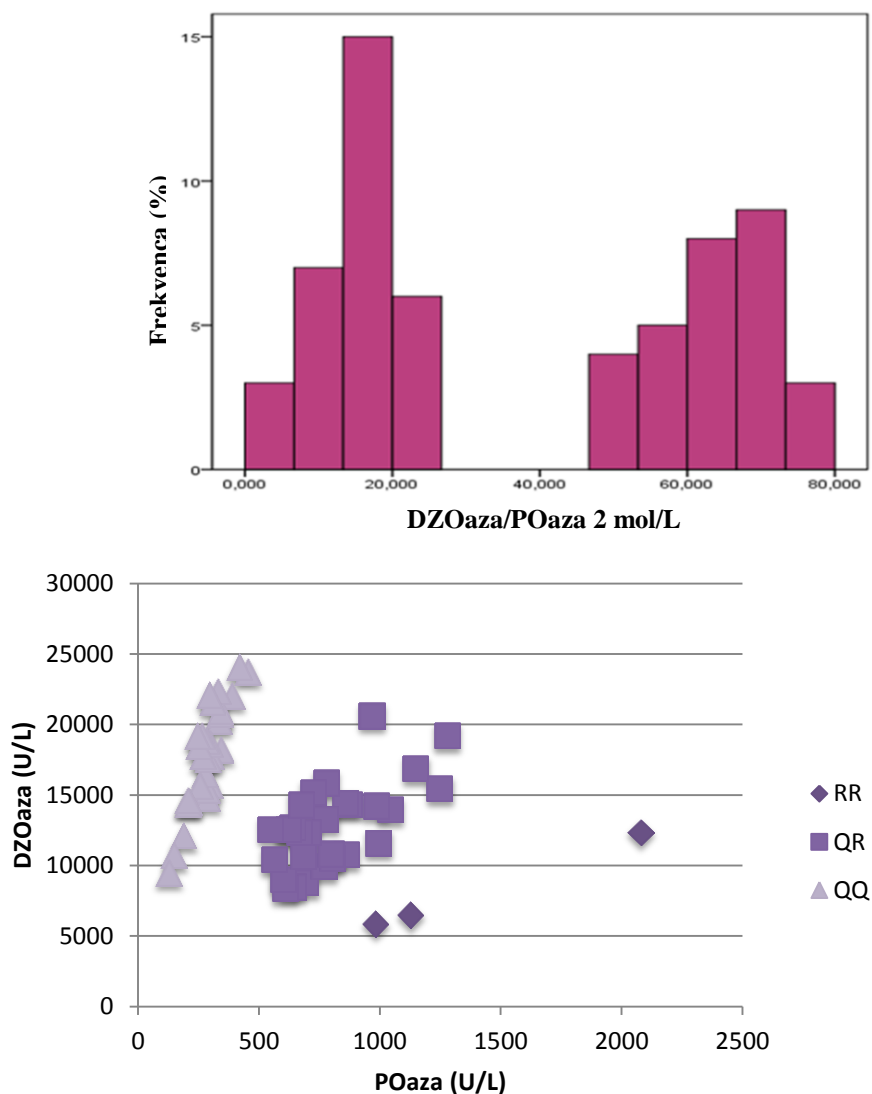
Za koncentracije soli gde je postignuto odgovarajuće razdvajanje fenotipova određene su i antimodalne vrednosti tj. utvrđena je granica između RR i QR fenotipa, kao i granica između QR i QQ fenotipa. Ove vrednosti su prikazane u Tabeli 22.

Tabela 22. Antimodalne vrednosti DZOaza/POaza odnosa koje definišu granicu između fenotipova za navedenu kombinaciju koncentracija NaCl (kombinacije koje nisu dale zadovoljavajuće razdvajanje nisu predstavljene)

Odnos aktivnosti	RR	QR	QQ
DZOaza/POaza 1 mol/L	11	19 - 32	71-164
DZOaza/POaza 2 mol/L	6	12-23	51-78
DZOaza 1 mol/L/POaza 2 mol/L	7	12-23	44-75
DZOaza 2 mol/L/POaza 1 mol/L	9	18-39	81-173
DZOaza 3 mol/L/POaza 1 mol/L	6	13-28	50-139
DZOaza 3 mol/L/POaza 2 mol/L	3-4	7-16	24-61
DZOaza 4 mol/L/POaza 1 mol/L	4	9-22	46-101
DZOaza 4 mol/L/POaza 2 mol/L	2-3	6-13	30-45

Na Slici 17 dati su histogrami raspodele i populacioni dijagrami odnosa DZOaza/POaza za koncentraciju NaCl od 2 mol/L uz koje je postignuto dobro razdvajanje fenotipova. Nisu

prikazani histogrami na kojima nije postignuto dobro razdvajanje fenotipova kao ni histogrami uz druge kombinacije koncentracija soli gde je postignuto adekvatno razdvajanje. U daljem radu opredelili smo se za koncentraciju soli od 2 mol/L u puferu, a koja je bila i predložena u originalnoj metodi za određivanje enzimske aktivnosti.

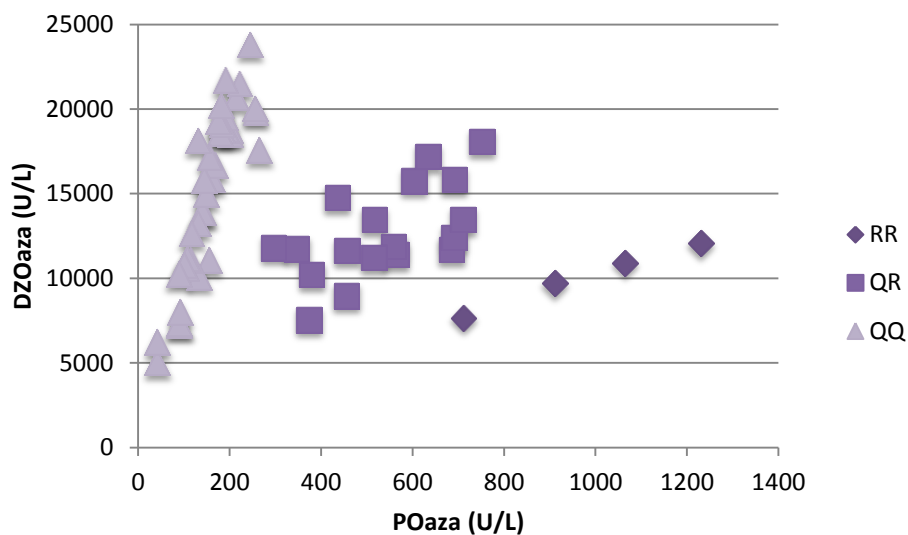
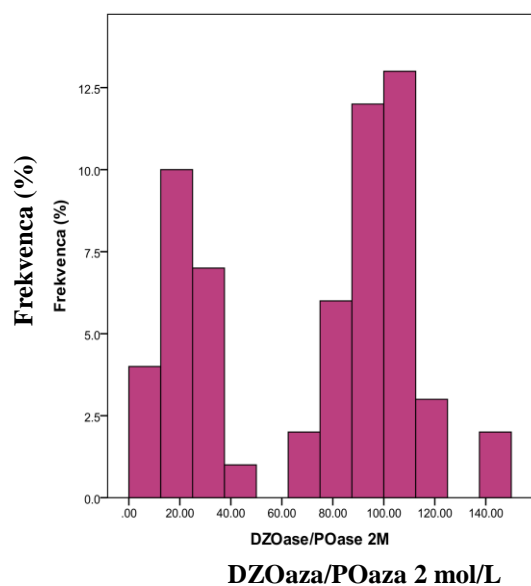


Slika 17. Histogram raspodele i populacioni dijagram odnosa DZOazne prema POaznoj aktivnosti za koncentraciju soli od 2 mol/L za kontrolnu grupu (nisu prikazani histogrami i dijagrami onih koncentracija uz koje nije postignuto adekvatno razdvajanje fenotipova)

4.5.5. Fenotip aktivnosti PON1 za položaj 192 (Q/R)

Određivanjem aktivnosti PON1 prema nefiziološkim supstratima, paraoksonu i diazoksonu, a zatim konstruisanjem grafika ove dve aktivnosti gde se na x-osi nalazi POazna aktivnost, a na y-osi DZOazna aktivnost, posebno za kontrolnu grupu i posebno za grupu pacijenata, moguće je odrediti PON1 fenotip aktivnosti za položaj 192 (99). Na ovaj način, utvrđene su vrednosti DZOaza/POaza odnosa koje određuju granicu između RR i QR fenotipa, kao i između QR i QQ fenotipa i kod kontrolne grupe i kod pacijenata. Za kontrolnu grupu, te granice su date u Tabeli 19. Za pacijente, QQ fenotip imaju osobe sa vrednošću odnosa dve PON1 aktivnosti od 66 do 148, QR fenotip sa vrednostima od 17 do 40 i RR fenotip sa vrednostima od 10 do 11.

Na Slici 18, prikazan je histogram DZOaze/POaze i populacioni dijagram odnosa DZOazne prema POaznoj aktivnosti samo za grupu pacijenata.



Vrednosti frekvenci fenotipova i alela enzima PON1 za položaj 192 kod kontrolne grupe i grupe pacijenata sa sarkoidozom predstavljani su u Tabeli 23.

Tabela 23. Frekvence fenotipova i alela PON1 za položaj 192 kod kontrolne grupe i grupe pacijenata

	PON1 fenotipovi			PON1 aleli	
	QQ (N)	QR (N)	RR (N)	Q	R
Kontrolna grupa	0,483 (29)	0,467 (28)	0,050 (3)	0,717	0,283
Sarkoidoza	0,633 (38)	0,300 (18)	0,067 (4)	0,783	0,217
P*		0,171		0,233	

*Chi-kvadrat test

Rezultati Chi-kvadrat testa pokazali su da nema značajne razlike u raspodeli fenotipova PON1₁₉₂ između kontrolne grupe i grupe pacijenata. Nije uočeno ni značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže ni za pacijente ni za kontrolnu grupu ($\chi^2=1,132$ za kontrolnu grupu i $\chi^2=0,814$ za grupu pacijenata). Distribucija Q i R alela u ispitivanim grupama nije bila značajno različita.

4.5.2. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u kontrolnoj grupi

Pošto smo se opredelili da određivanja enzimske aktivnosti radimo uz pufer čija je koncentracija NaCl 2 mol/L, dalji rezultati će biti prikazani samo za aktivnosti dobijene uz navedenu koncentraciju soli.

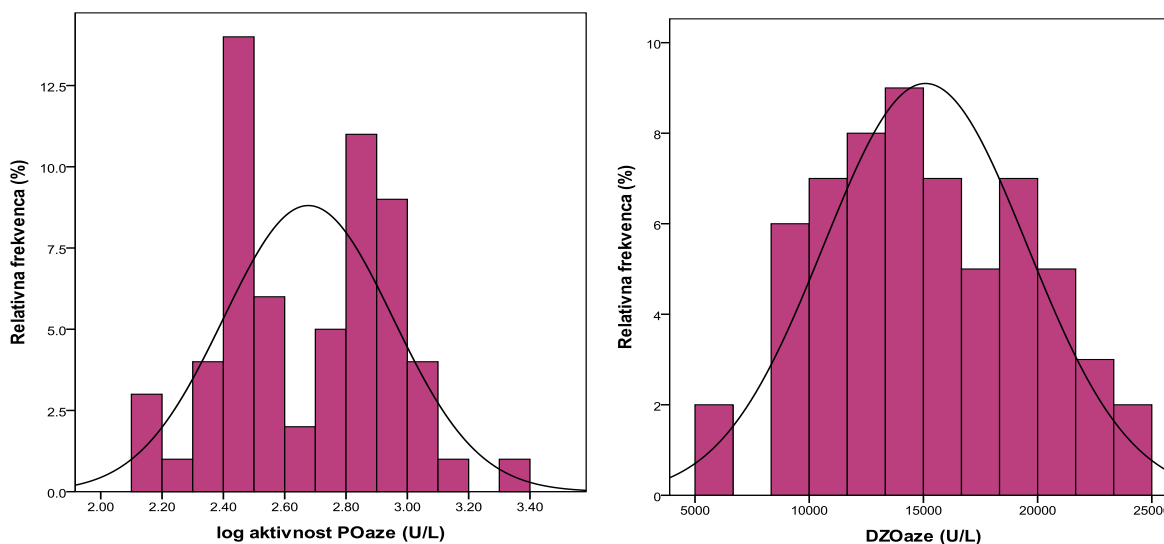
Osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost u kontrolnoj grupi su prikazani u Tabeli 24. Kolmogorov-Smirnov test je pokazao da POazna aktivnost sledi normalnu raspodelu nakon logaritamske transformacije, pa je prikazana kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti dok DZOazna aktivnost prati normalnu raspodelu i predstavljena je kao aritmetička srednja vrednost i standardna devijacija.

Histogrami raspodele POazne i DZOazne aktivnosti u kontrolnoj grupi dati su na Slici 19. Posmatrajući grafik, može da se vidi da je raspodela POaznih aktivnosti bimodalna dok je raspodela DZOaznih aktivnosti unimodalna.

Tabela 24. Osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u kontrolnoj grupi

	POazna akt (U/L)	DZOazna akt (U/L)
Srednja vrednost	475*	15089
95% interval pouzdanosti	403-559	13947-16230
Standardna devijacija	-	4457
Medijana	550	-
Interkvartilni raspon	288-783	-
Koef asimetrije	-0,028 (P=0,925)	0,074 (P=0,802)
Koef zaobljenosti	-0,860 (P=0,036)	-0,752 (P=0,094)
Kolmogorov- Smirnov test	P=0,167	P=0,932

*Geometrijska srednja vrednost



Slika 19. Raspodela POazne i DZOazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj grupi

4.5.3. Ispitivanje raspodele i osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u grupi pacijenata

Osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost u grupi pacijenata sa sarkoidozom su dati u Tabeli 25. Primenom Kolmogorov-Smirnov testa, utvrđeno je da POazna aktivnost ima

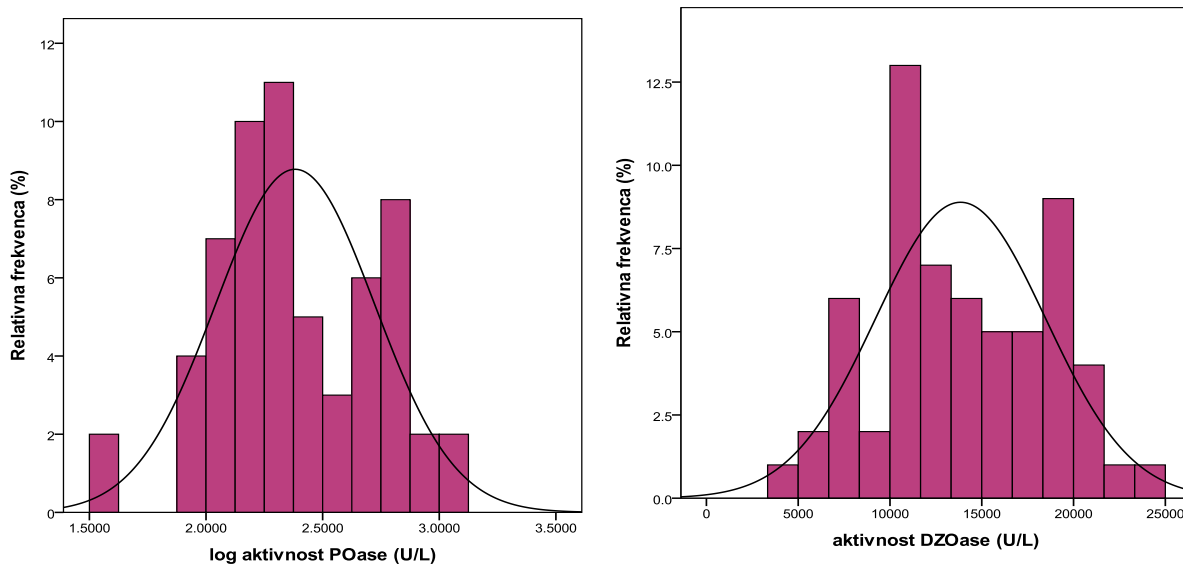
log-normalnu raspodelu, pa su podaci prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti. DZOazna aktivnost sledi normalnu raspodelu i predstavljena je kao aritmetička srednja vrednost i standardna devijacija.

Histogrami raspodele POazne i DZOazne aktivnosti u grupi pacijenata predstavljeni su na Slici 20. Posmatrajući grafik, može da se vidi da je raspodela i POaznih i DZOaznih aktivnosti aktivnosti bimodalna.

Tabela 25. Osnovni statistički podaci za POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u grupi pacijenata sa sarkoidozom

	POazna akt (U/L)	DZOazna akt (U/L)
Srednja vrednost	241*	13847
95% interval pouzdanosti	197-295	12669-15024
Standardna devijacija	-	4637
Medijana	196	-
Interkvartilni raspon	142-487	-
Koef asimetrije	0,130 (P=0,661)	0,057 (P=0,845)
Koef zaobljenosti	-0,576 (P=0,276)	-0,896 (P=0,023)
Kolmogorov- Smirnov test	P=0,289	P=0,503

*Geometrijska srednja vrednost



Slika 20. Raspodela POazne i DZOazne aktivnosti PON1 u grupi pacijenata

4.5.4. Poređenje POazne i DZOazne aktivnosti PON1 između kontrolne grupe i grupe pacijenata

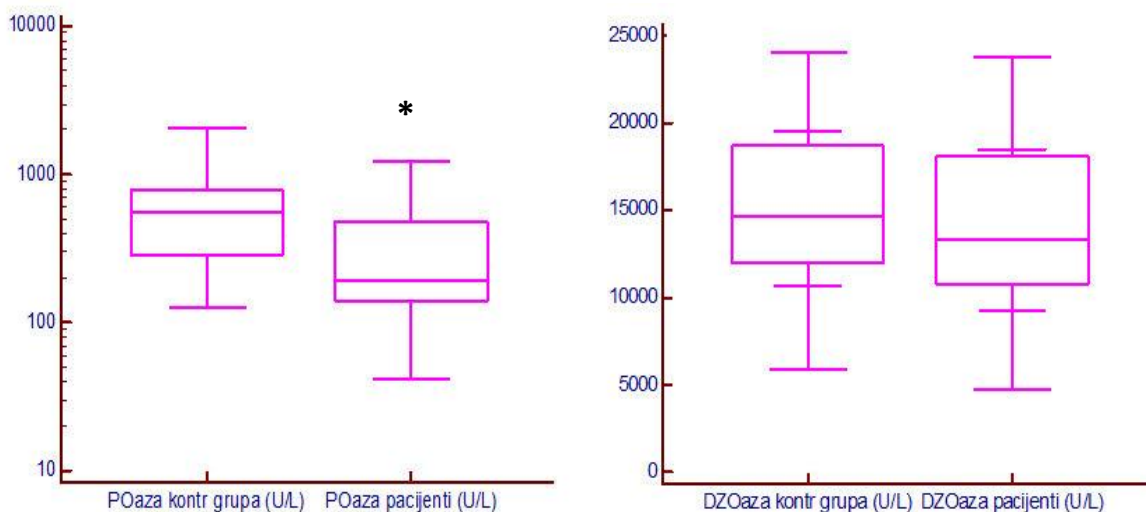
POazna i DZOazna aktivnost PON1 kontrolne grupe i grupe pacijenata prikazani su u Tabeli 26 i na Slici 21. Pošto podaci za POaznu aktivnost prate log-normalnu raspodelu kod obe grupe, poređenje među njima je urađeno Studentovim t-testom sa logaritmovanim vrednostima. Distribucija za DZOaznu aktivnost ima normalan tok kod obe grupe, pa je razlika testirana Studentovim t-testom.

Pokazalo se da je POazna aktivnost bila značajno niža kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu dok je DZOaza takođe bila niža, ali razlika nije dostigla statističku značajnost.

Tabela 26. POazna i DZOazna aktivnost PON1 između kontrolne grupe i grupe pacijenata

Enzimska aktivnost	Kontrolna grupa	Sarkoidoza	P ^a
POaza (U/L)	475 (403-559)	241 (197-295)	<0,001
DZOaza (U/L)	15089 ± 4457	13847 ± 4637	0,133

Podaci za POazu su prikazani kao geometrijska srednja vrednja i 95% interval pouzdanosti, a za DZOazu ako aritmetička srednja vrednost ± standardna devijacija; ^a Studentov t-test



Slika 21. Grafički prikaz srednjih vrednosti POazne i DZOazne aktivnosti PON1 kontrolne grupe i grupe pacijenata *P<0,001

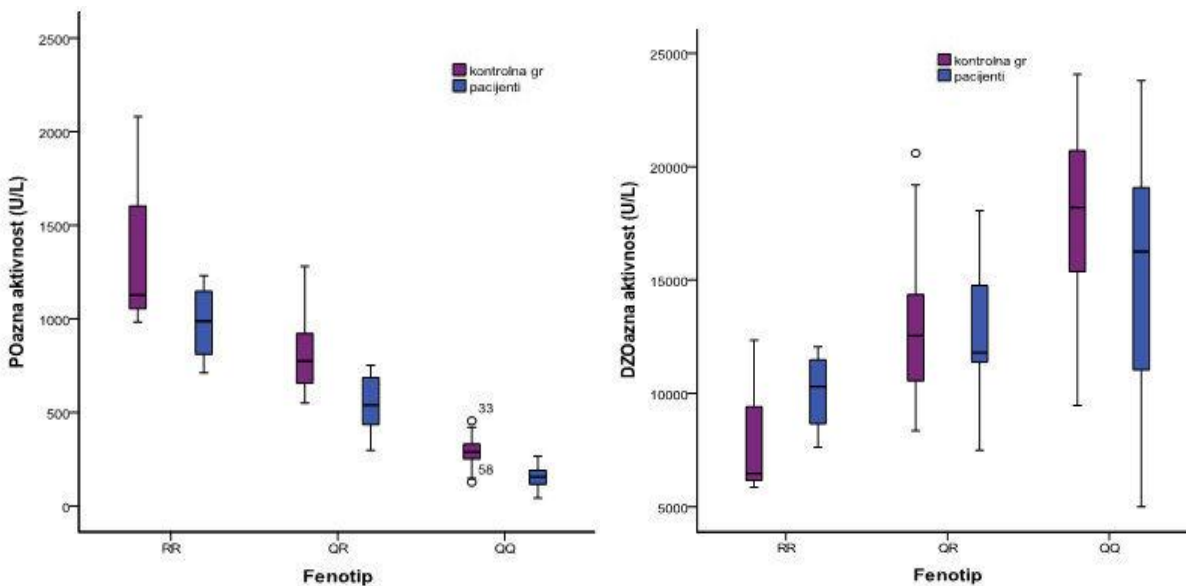
(POaza – podaci su prikazani kao geometrijske srednje vrednosti i 95% interval pouzdanosti; DZOaza - podaci su prikazani kao srednja vrednost i standardna devijacija)

U Tabeli 27 i na Slici 22 prikazane su POazne i DZOazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa sarkoidozom prema fenotipovima PON1.

Tabela 27. POazne i DZOazne aktivnosti PON1 u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata prema PON1 fenotipovima

Fenotip	POaza (U/L)		DZOaza (U/L)	
	Kontrolna gr	Sarkoidoza	Kontrolna gr	Sarkoidoza
QQ	284 ± 73	156 ± 56**	17820 ± 3716	15184 ± 4945*
QR	806 ± 200	537±139**	12820±3068	12698±2759
RR	^a 1321 (490-3560)	960 (662-1393)	8227±3580	10071±1890

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija; a-Podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti
*P<0,05; **P<0,0001; Studentov t-test



Slika 22. Hidrolitička aktivnost enzima PON1 prema paraoksonu i diazoksonu u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata.

Kod QQ fenotipa, uočava se da su i POazna i DZOazna aktivnost značajno niže kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom; kod QR fenotipa, značajno niža je bila samo POazna aktivnost dok se aktivnosti POaze, ni DZOaze nisu razlikovale značajno između kontrolne grupe i pacijenata kod RR fenotipa.

4.5.6. Korelacije aktivnosti enzima PON1 sa parametrima inflamacije, oksidativno-stresnog statusa i lipidnog statusa u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata

U cilju utvrđivanja korelacije enzima PON1 sa parametrima inflamacije, oksidativno-stresnog statusa i lipidnog profila, korišćena je Spearman-ova korelaciona analiza. Rezultati dobijeni u ovoj analizi predstavljeni su u Tabeli 28 za kontrolnu grupu i u Tabeli 29 za grupu pacijenata sa sarkoidozom.

Tabela 28. Spearmanova korelaciona analiza za PON1 aktivnosti i inflamatorne, lipidne i parametre oksidativno-stresnog statusa u kontrolnoj grupi

Parametar	POaza (U/L)		DZOaza (U/L)	
	ρ	P	ρ	P
UH (mmol/L)	-0,062	0,637	0,186	0,154
HDL-H (mmol/L)	0,071	0,591	0,246	0,058
LDL-H (mmol/L)	-0,073	0,580	0,129	0,325
TG (mmol/L)	-0,135	0,305	0,018	0,890
hsCRP (mg/L)	0,261	0,046	0,006	0,964
SAA ($\mu\text{g/L}$)	0,253	0,185	0,053	0,786
SOD (U/L)	0,147	0,259	0,125	0,341
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	-0,168	0,207	0,128	0,342
SH grupe (mmol/L)	0,012	0,928	-0,046	0,734
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	-0,277	0,033	-0,203	0,126
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	-0,054	0,685	-0,013	0,922
PAB (HK jed)	0,210	0,069	0,104	0,269

ρ - Spearmanov koeficijent korelacije

Rezultati Spearmanove korelacione analize u kontrolnoj grupi su pokazali da se jedino POazna aktivnost nalazi u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa hsCRP i u negativnoj sa MDA.

Tabela 29. Spearmanova korelaciona analiza za PON1 aktivnosti i inflamatorne, lipidne i parametre oksidativno-stresnog statusa u grupi pacijenata

Parametar	POaza (U/L)		DZOaza (U/L)	
	ρ	P	ρ	P
UH (mmol/L)	0,426	0,005	0,288	0,061
HDL-H (mmol/L)	0,352	0,045	0,300	0,107
LDL-H (mmol/L)	0,432	0,019	0,270	0,150
TG (mmol/L)	-0,253	0,110	-0,068	0,670
ACE (U/L)	0,110	0,592	0,007	0,970
hsCRP (mg/L)	0,035	0,882	0,027	0,910
SAA ($\mu\text{g/L}$)	0,009	0,955	-0,338	0,023
SOD (U/L)	-0,127	0,383	-0,050	0,729
TAS ($\mu\text{mol/L}$)	0,128	0,388	-0,268	0,060
SH grupe (mmol/L)	-0,025	0,865	0,189	0,194
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0,064	0,667	-0,272	0,040
TOS ($\mu\text{mol/L}$)	0,140	0,355	-0,255	0,080
PAB (HK jed)	-0,039	0,788	-0,425	0,002

ρ - Spearmanov koeficijent korelacije

U grupi pacijenata sa sarkoidozom, POazna aktivnost je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa UH, HDL-H i LDL-H, ali nije bilo značajnih korelacija sa parametrima inflamacije i oksidativno-stresnog statusa. U slučaju DZOazne aktivnosti, pokazano je postoji značajna negativna korelacija sa SAA, MDA i PAB.

4.5.7. Ispitivanje nezavisnog uticaja parametara inflamacije, lipidnog statusa i oksidativno-stresnog statusa na POaznu i DZOaznu aktivnost PON1 u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata

Da bi se utvrdilo da li inflamatorni markeri, lipidi, kao i oksidativni stres ispoljavaju nezavisni uticaj na PON1 aktivnost, primenjena je multipla linearna regresiona analiza. Modeli u multivarijantnoj analizi su pravljani na osnovu toga kolika je bila značajnost Spearmanovog koeficijenta korelacije u univarijantnoj analizi. Za nezavisne varijable u modelu birane su one čija je značajnost za Spearmanov koeficijent korelacije bila $\leq 0,1$.

U kontrolnoj grupi, utvrđeno je da je samo MDA nezavistan prediktor POazne aktivnosti ($\beta=-0,320$, $P=0,008$, adj. $R^2=0,220$) kada su DZOaza i MDA bili uključeni u model.

U grupi pacijenata, utvrđen je nezavistan uticaj promene u koncentraciji LDL-H na POaznu aktivnost ($\beta=0,694$, $P=0,040$, adj. $R^2=0,330$) kada su UH, HDL-H i LDL-H predstavljali nezavisne varijable u modelu. U cilju procene nezavisnog uticaja različitih varijabli na DZOaznu aktivnost, napravljena su tri modela. Model 1 je sadržao UH, HDL-H, SAA, TOS, PAB i MDA; model 2 je uključivao lipidne parametre, SAA i TOS; a u modelu 3 su se nalazili SAA i parametri oksidativnog stresa, ali bez lipidnih parametara. Za sva tri modela, pronađeno je da povećanje u koncentraciji SAA ima nezavistan uticaj na smanjenje DZOazne aktivnosti. Takođe, utvrđeno je da 71% varijacije u DZOaznoj aktivnosti može da se objasni povećanjem koncentracije TOS-a, PAB-a i SAA (model 1); 48% varijacije u DZOaznoj aktivnosti potiče od varijacija u TOS-u i SAA (model 2) dok 46% varijacija DZOaze može da se pripiše varijacijama u koncentraciji PAB-a i SAA (model 3). Rezultati ove analize su dati u Tabeli 30.

Tabela 30. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja SAA, lipidnih i parametara oksidativnog stresa na DZOaznu aktivnost PON1 u grupi pacijenata

Model	Nezavisne varijable (β , nivo značajnosti)*#
	TOS ($\beta = -0,504$, $P = 0,013$)
Model 1 (adj. $R^2 = 0,711$)	PAB ($\beta = -0,485$, $P = 0,016$)
	SAA ($\beta = -0,525$, $P = 0,006$)
Model 2 (adj. $R^2 = 0,476$)	SAA ($\beta = -0,558$, $P = 0,007$)
	TOS ($\beta = -0,625$, $P = 0,003$)
Model 3 (adj. $R^2 = 0,456$)	SAA ($\beta = -0,442$, $P = 0,003$)
	PAB ($\beta = -0,585$, $P = 0,001$)

* Model je uključio parametre čije je P u Spearmanovoj korelacionoj analizi bilo $\leq 0,1$

Model 1: UH, HDL-H, TOS, MDA, PAB i SAA

Model 2: UH, HDL-H, SAA i TOS

Model 3: SAA, PAB, TOS i MDA

U Tabeli nisu prikazane varijable iz modela koje nisu pokazale značajnu korelaciju sa DZOaze

4.6. Parametri inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u akutnoj i hroničnoj sarkoidozi

4.6.1. Poređenje parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa između kontrolne grupe, pacijenata sa akutnom i pacijenata sa hroničnom sarkoidozom

Sarkoidoza može imati akutni i hronični tok. Akutni tok bolesti se obično smatra blažim jer može doći do spontane remisije dok hronična bolest perzistira, obično se karakteriše većim stepenom inflamacije i može da dovede do dalje progresije oboljenja. Zbog toga, poredili smo sve prethodno pomenute parametre između pacijenata sa akutnim i hroničnim tokom bolesti, kao i zdravih ispitanika. Rezultati ove analize su dati u Tabelama 31, 32 i 33.

Tabela 31. Osnovne karakteristike, inflamatorni i lipidni parametri u kontrolnoj grupi, grupi pacijenata sa akutnim i grupi sa hroničnim tokom sarkoidoze

Parametar	Akutna sarkoidoza	Hronična sarkoidoza	Kontrolna grupa	P ^a
Glukoza (mmol/L)	5,36 ± 1,71	5,46 ± 2,73	4,78 ± 0,71 ^{b*, c**}	<0,01
Ureja (mmol/L)	5,72 ± 1,45	5,55 ± 1,80	5,80 ± 1,70 ^{c**}	<0,05
Kreatinin (μmol/L)	80,1 ± 12,8	79,4 ± 16,4	79,2 ± 15,7	0,425
Mokraćna kiselina (μmol/L)	289 ± 88	287 ± 74	284 ± 106	0,675
Ukupni proteini (g/L)	72,2 ± 8,8	72,0 ± 5,1	70,5 ± 5,4 ^{b, c*}	<0,05
Albumin (g/L)	43,6 ± 2,9	44,0 ± 3,6	35,0 ± 1,5 ^{b, c***}	<0,001
hsCRP (mg/L) #	1,86 (1,46-2,37)	1,44 (1,13-1,83)	1,13 (0,96-1,33) _{b, c*}	<0,05
ACE (U/L) #	41,8 (9,3-56,0)	44,0 (32,0-52,0)	/	0,160 ^d
SAA (μg/L) #	11,09 (7,20-17,08)	8,18 (5,64-11,88)	2,60 (2,03-3,33) _{b, c***}	<0,001
UH (mmol/L)	6,36 ± 1,84	6,09 ± 1,21	5,57 ± 1,20 ^{b, c***}	<0,001
LDL-H (mmol/L)	4,11 ± 1,77	3,87 ± 0,99	3,58 ± 1,06 ^{b**}	<0,01
HDL-H (mmol/L)	1,41 ± 0,46	1,27 ± 0,40	1,52 ± 0,39 ^{c*}	<0,05
TG (mmol/L) #	1,98 (1,75-2,24)	1,83 (1,67-2,00)	1,28 (1,17-1,40) _{b, c***}	<0,001
Doza prednizolona (mg/dan) ¥	5 (5-10)	10 (5-10)	/	0,430 ^e
Trajanje terapije (meseći) ¥	12 (12-24)	36 (18-48)	/	<0,05^e

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± stand devijacija (ako nije drugačije naznačeno); # podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti; ¥ podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon; a - Anova test (ako nije drugačije naznačeno); b - Značajno različit u odnosu na akutni tok bolesti (*Tukey post-hoc test*); c - Značajno različit u odnosu na hronični tok bolesti (*Tukey post-hoc test*); d - Studentov t-test; e - Mann-Whitney test; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Rezultati prikazani u Tabeli 31 ukazuju da su koncentracije glukoze, ukupnih proteina, albumina, hsCRP-a, SAA, UH i TG bile značajno veće u obema grupama pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija LDL-H je bila značajno viša kod akutnog toka, a koncentracije ureje i HDL-H su bile značajno niže kod hroničnog toka bolesti kad se porede sa zdravim ispitanicima. Aktivnost ACE se nije značajno razlikovala između akutnog i hroničnog toka sarkoidoze, kao ni doza primenjenog leka. Očekivano, terapija je bila značajno duže zastupljena kod hronične bolesti u odnosu na akutnu.

Tabela 32. Distribucija LDL i HDL subklasa u kontrolnoj grupi, grupi pacijenata sa akutnim i grupi sa hroničnim tokom sarkoidoze

Parametar	Akutna sarkoidoza	Hronična sarkoidoza	Kontrolna grupa	P ^a
Dominantni LDL dijametar (nm)	27,6 ± 1,0	27,0 ± 1,1	27,0 ± 1,7	0,176
LDL I (%)	23,7 ± 5,4	21,8 ± 4,5	36,9 ± 8,3 ^{b, c***}	<0,001
LDL II (%)	24,8 ± 3,7	24,9 ± 4,1	12,2 ± 2,9 ^{b, c***}	<0,001
LDLIII (%)	20,1 ± 2,6	20,5 ± 2,9	16,5 ± 4,1 ^{b, c***}	<0,001
LDL IVA (%)	12,4 ± 2,4	12,8 ± 2,4	11,3 ± 2,9 ^{c**}	<0,01
LDL IVB (%)	18,9 ± 3,8	19,9 ± 5,7	23,0 ± 6,3 ^{b***, c*}	<0,01
LDL IV (%)	31,4 ± 4,6	32,7 ± 6,9	34,3 ± 8,2	0,125
Male, guste LDL (%)	51,5 ± 5,9	53,2 ± 6,4	50,9 ± 8,3	0,220
Dominantni HDL dijametar (nm)	9,7 ± 1,2	9,5 ± 1,1	10,4 ± 1,1 ^{b*, c***}	<0,001
HDL 2b (%)	41,2 ± 10,4	42,2 ± 8,7	43,2 ± 7,2	0,538
HDL 2a (%)	21,3 ± 2,6	20,8 ± 2,4	19,4 ± 4,5 ^{b*}	<0,05
HDL 3a (%)	15,9 ± 4,0	15,7 ± 3,0	14,2 ± 3,2 ^{c*}	<0,05
HDL 3b (%)	9,2 ± 2,9	10,0 ± 4,4	9,8 ± 2,9	0,663
HDL 3c (%)	11,3 ± 6,2	11,3 ± 6,4	12,9 ± 5,7	0,270
Male HDL čestice (%)	36,5 ± 9,7	37,0 ± 9,1	36,9 ± 8,8	0,974

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± stand devijacija; a- Anova test; b - Značajno različit u odnosu na akutni tok bolesti (*Tukey post-hoc test*); c - Značajno različit u odnosu na hronični tok bolesti (*Tukey post-hoc test*); *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Rezultati prikazani u Tabeli 32 ukazuju da su relativni udeli LDL II, LDL III bili značajno veći, dok su relativne proporcije LDL I i LDL IVB i dominantni dijametri HDL čestica bili značajno niži u obema grupama pacijenata prema kontrolnoj grupi. Relativna proporcija HDL 2a je bila značajno veća u akutnoj sarkoidozi u odnosu na kontrolnu grupu, a relativne proporcije LDL IVA i HDL 3a su bile značajno veće u hroničnoj sarkoidozi prema kontrolnoj grupi.

Tabela 33. Oksidativno-stresni status i PON1 status u kontrolnoj grupi, grupi pacijenata sa akutnim i grupi sa hroničnim tokom sarkoidoze

Parametar	Akutna sarkoidoza	Hronična sarkoidoza	Kontrolna grupa	P ^a
S-TOS (µmol/L) #	9,61 (7,65-12,07)	9,91 (8,35-11,75)	4,33 (3,83-4,88) ^{b, c***}	<0,001
S-MDA (µmol/L) #	1,23 (1,17-1,28)	1,15 (1,09-1,21)	0,74 (0,67-0,81) ^{b, c***}	<0,001
S-PAB (HK jed)	85,0 ± 41,3	87,8 ± 39,8	63,2 ± 36,4 ^{b, c***}	<0,001
S- SH grupe (mmol/L)	0,470 ± 0,150	0,455 ± 0,143	0,514 ± 0,109 ^{b, c***}	<0,001
S- TAS (µmol/L) #	954 (877-1038)	953 (903-1006)	1126 (1096-1157) ^{b, c**}	<0,01
S- SOD (U/L) ¥	20,0 (13,0-25,2)	18,0 (12,25-23,0)	96,0 (37,0-125,0) ^{e, f***}	<0,001 ^d
H-MDA (µmol/gHb)	0,164 ± 0,069	0,166 ± 0,049	0,097 ± 0,055 ^{b, c***}	<0,001
H-SOD (U/gHb)	4,78 ± 2,13	5,72 ± 3,28	7,14 ± 5,57	0,071
H-O ₂ ⁻ (µmol/min/gHb) #	11,1 (9,9-12,5)	11,9 (10,3-13,8)	8,2 (7,4-9,1) ^{b, c***}	<0,001
H-TOS (µmol/gHb) #	7,8 (6,7-9,0)	8,3 (6,9-9,9)	6,6 (5,8-7,6)	0,139
H-SH grupe (mmol/gHb) ¥	0,397 (0,220-1,103)	0,407(0,311-1,135)	0,220 (0,140-0,350) ^{e, f***}	<0,001 ^d
POaza (U/L) #	294 (183-472)	236 (178-313)	475 (404-559) ^{b, c***}	<0,001
DZOaza (U/L)	13272 ± 4965	13262 ± 4653	15088 ± 4457	0,117

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± stand devijacija; # podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti; ¥ podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon; a- Anova test (ako nije drugačije naznačeno); b - Značajno različit u odnosu na akutni tok bolesti (*Tukey post-hoc* test); c - Značajno različit u odnosu na hronični tok bolesti (*Tukey post-hoc* test); d – KruskalWallis test; e - Značajno različit u odnosu na akutni tok bolesti (*MannWhitney* test); f - Značajno različit u odnosu na hronični tok bolesti (*MannWhitney* test); **P<0,01; ***P<0,001

Rezultati prikazani u Tabeli 33 pokazuju da su koncentracije serumskog TOS-a, MDA, PAB-a, eritrocitnog MDA, O₂⁻ i SH grupa bile značajno veće, dok su koncentracija serumskih SH grupa i

TAS-a, aktivnost serumskog SOD-a i POaze bile značajno niže u obema grupama pacijenata prema kontrolnoj grupi.

4.6.2. Korelacije parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u akutnoj i hroničnoj sarkoidozi

Nadalje, ispitali smo korelacije inflamatornih markera sa parametrima lipidnog statusa i raspodelom lipoproteinskih subfrakcija, markerima oksidativnog stresa i PON1 statusom kod pacijenata sa akutnim i hroničnim tokom bolesti. U Tabeli 34 date su korelacije parametara ACE, hsCRP i SAA sa koncentracijama lipidnih parametara i relativnim udelima LDL i HDL subklasa, kao i korelacije sa oksidativno-stresnim i PON1 statusom u akutnoj sarkoidozi. Korelacije sa eritrocitnim parametrima oksidativno-stresnog statusa nisu bile značajne, pa ovi rezultati nisu predstavljeni u tabelama.

Tabela 34. Spearman-ova korelaciona analiza parametara ACE, hsCRP i SAA sa koncentracijama lipida i proporcijama LDL i HDL subklasa, serumskim oksidativno-stresnim statusom i PON1 u akutnoj sarkoidozi

Parametar	ACE (U/L)	hsCRP (mg/L)	SAA ($\mu\text{g/L}$)
UH (mmol/L)	-0,112	0,098	-0,655*
HDL-H (mmol/L)	-0,122	0,044	-0,673
LDL-H (mmol/L)	-0,132	0,364*	-0,349
TG (mmol/L)	0,027	-0,105	-0,244
Domin LDL dijametar (nm)	-0,080	0,313	-0,501
LDL I (%)	0,600	-0,780*	-0,390
LDL II (%)	0,758*	0,227	0,654
LDLIII (%)	0,077	-0,283	0,085
LDL IV (%)	0,484	0,442	0,145
Male, guste LDL čestice (%)	0,362	0,263	-0,619
Domin HDL dijametar (nm)	0,098	-0,414	-0,021
HDL 2b (%)	-0,012	-0,453	-0,631
HDL 2a (%)	0,232	0,714*	0,050
HDL 3a (%)	-0,339	0,411	0,551
HDL 3b (%)	-0,091	0,549	0,591
HDL 3c (%)	0,610	0,207	0,746*
Male HDL čestice (%)	0,076	0,382	0,648
S-TOS ($\mu\text{mol/L}$)	-0,101	-0,186	-0,572
S-MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0,170	0,279	0,287
S-PAB (HK units)	0,236	0,365**	0,154
S- SH grupe (mmol/L)	-0,235	-0,044	-0,066
S- TAS ($\mu\text{mol/L}$)	0,048	0,009	0,147
S- SOD (U/L)	-0,113	-0,021	-0,072
POaza (U/L)	-0,001	0,036	0,285
DZOaza (U/L)	0,169	0,202	-0,257

*P<0,05; **P<0,01

Korelaciona analiza pokazuje da postoji značajna pozitivna korelacija između aktivnosti ACE i proporcije LDL II, koncentracija hsCRP-a i LDL-H, proporcije HDL 2a subfrakcija i PAB-a, kao i između SAA i proporcija HDL 3c. Značajna negativna korelacija je uočena kod povezanosti hsCRP-a i relativne proporcije LDL I subfrakcija, kao i kod povezanosti SAA sa koncentracijom UH.

Utvrđivanje prethodno navedenih korelacija je rađeno i kod pacijenata sa hroničnim tokom bolesti. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 35.

Tabela 35. Spearman-ova korelaciona analiza parametara ACE, hsCRP i SAA sa koncentracijama lipida i proporcijama LDL i HDL subklasa, serumskim oksidativno-stresnim statusom i PON1 u hroničnoj sarkoidozi

Parametar	ACE (U/L)	hsCRP (mg/L)	SAA (µg/L)
UH (mmol/L)	-0,289*	-0,162	-0,077
HDL-H (mmol/L)	-0,070	-0,408**	-0,034
LDL-H (mmol/L)	-0,229	-0,024	0,106
TG (mmol/L)	-0,116	0,005	0,198
Domin LDL dijametar (nm)	-0,309	-0,033	-0,403
LDL I (%)	-0,096	0,102	-0,228
LDL II (%)	0,160	-0,004	0,383
LDLIII (%)	0,012	0,306	0,258
LDL IV (%)	-0,030	-0,158	-0,189
Male, guste LDL čestice (%)	-0,025	-0,055	-0,050
Domin HDL dijametar (nm)	-0,197	-0,133	-0,162
HDL 2b (%)	-0,070	-0,467	0,127
HDL 2a (%)	0,149	-0,077	0,343
HDL 3a (%)	0,110	0,153	-0,090
HDL 3b (%)	0,032	0,530	-0,158
HDL 3c (%)	-0,032	0,483	-0,175
male HDL čestice (%)	0,027	0,525	-0,228
S-TOS (µmol/L)	-0,070	0,063	0,064
S-MDA (µmol/L)	-0,053	0,093	0,178
S-PAB (HK units)	0,252*	0,355**	0,198
S- SH grupe (mmol/L)	0,119	-0,114	-0,258
S- TAS (µmol/L)	0,167	0,333*	-0,042
S- SOD (U/L)	-0,037	-0,018	-0,064
POaza (U/L)	0,274	-0,091	0,488*
DZOaza (U/L)	-0,363	0,072	-0,559**

*P<0.05; **P<0,01

Dobijeni rezultati pokazuju da je u hroničnoj sarkoidozi zastupljena značajna negativna korelacija između aktivnosti ACE i UH, kao i između koncentracije hsCRP-a i HDL-H. Takođe, uočena je značajna pozitivna korelacija hsCRP-a sa TAS-om i PAB-om, ACE sa PAB-om i SAA sa POaznom aktivnošću dok je značajna inverzna asocijacija bila primećena između SAA i DZOazne aktivnosti.

4.6.3. Ispitivanje nezavisnog uticaja LDL i HDL subfrakcija i oksidativno-stresnog statusa na tok sarkoidoze

Kako je cilj naše analize bio i da se utvrdi da li postoji povezanost između ispitivanih parametara i toka sarkoidoze, urađena je i multipla regresiona analiza koja je pokazala da li je prisutan nezavisni uticaj pomenutih parametara na tok bolesti. U ovoj analizi, napravljena su tri modela. Model 1 je, od nezavisnih varijabli, sadržao starost, pol, trajanje terapije, dominantni LDL i HDL dijametar i relativne proporcije LDL i HDL subfrakcija. Model 2 je sadržao starost, pol, trajanje terapije, serumske parametre oksidativno-stresnog statusa dok je model 3 bio sastavljen od starosti, pola, trajanja terapije, eritrocitnih parametara oksidativno-stresnog statusa. U modelu 1 trajanje terapije je bilo značajno nezavisno povezano sa hroničnom sarkoidozom što je i očekivano, ali su i relativne proporcije HDL 3a i HDL 3c bile značajno nezavisno povezane sa hroničnim tokom bolesti. Rezultati su dati u Tabeli 36. Model 2 i model 3 nisu imali parametre koji pokazuju nezavistan uticaj na tok oboljenja, pa rezultati dobijeni u ovim modelima nisu prikazani.

Tabela 36. Multipla linearna regresiona analiza povezanosti veličina i raspodela LDL i HDL subfrakcija sa tokom sarkoidoze

Parametar	β	P
Starost (godine)	0,311	0,110
Pol	0,572	0,090
Trajanje terapije (meseći)	1,163	0,040
Dominantni LDL dijametar (nm)	-0,556	0,070
LDL I (%)	-0,099	0,490
LDL II (%)	0,252	0,140
LDL III (%)	-0,138	0,220
LDL IV (%)	0,372	0,150
Dominantni HDL dijametar (nm)	0,312	0,160
HDL 2b (%)	9,952	0,050
HDL 2a (%)	1,157	0,080
HDL 3a (%)	5,210	0,030
HDL 3b (%)	-0,086	0,730
HDL 3c (%)	8,344	0,046

4.7. Parametri inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u plućnoj i plućnoj sarkoidozi udruženojsa vanplućnim manifestacijama

4.7.1. Poređenje parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa između kontrolne grupe, pacijenata sa plućnom i pacijenata sa kombinovanom plućnom i vanplućnom sarkoidozom

Smatra se da je vanplućna manifestacija koja uglavnom uključuje i zahvaćenost plućnog tkiva, teži oblik od isključivo plućne manifestacije. Zbog toga, poredili smo sve prethodno pomenute parametre kako bi se preciznije analizirala eventualna razlika između plućne lokalizacije, kombinovane plućne i vanplućne bolesti, kao i zdravih ispitanika. Rezultati ove analize su dati u Tabeli 37.

Tabela 37. Osnovne karakteristike, inflamatorni i lipidni parametri u kontrolnoj grupi, grupi pacijenata sa plućnom i grupi sa plućnom i vanplućnom lokalizacijom sarkoidoze

Parametar	Plućna sarkoidoza	Plućna i vanplućna sarkoidoza	Kontrolna grupa	P ^a
Glukoza (mmol/L)	5,52 ± 2,57	5,12 ± 1,43	4,78 ± 0,71 ^{b***}	<0,001
Urea (mmol/L)	5,76 ± 1,71	5,29 ± 1,43	5,80 ± 1,70 ^{c**}	<0,01
Kreatinin (µmol/L)	79,5 ± 13,6	80,4 ± 18,3	79,2 ± 15,7	0,486
Mokraćna kiselina (µmol/L)	285 ± 79	297 ± 84	284 ± 106	0,614
Ukupni proteini (g/L)	72,3 ± 7,46	71,3 ± 5,6	70,5 ± 5,4 ^{b, c*}	<0,05
Albumin (g/L)	44,0 ± 3,3	43,3 ± 3,3	35,0 ± 1,5 ^{b, c***}	<0,001
hsCRP (mg/L) #	1,71 (1,40-2,08)	1,30 (0,45-3,74)	1,13 (0,96-1,33) ^{b*}	<0,05
ACE (U/L) #	36,3 (25,5-52,9)	48,0 (35,9-65,0)	/	0,214 ^d
SAA (µg/L) #	8,58 (5,78-12,74)	8,71 (4,78-15,85)	2,60 (2,03-3,33) ^{b, c*}	<0,01
UH (mmol/L)	6,29 ± 1,61	5,99 ± 1,22	5,57 ± 1,20 ^{b***, c*}	<0,001
LDL-H (mmol/L)	4,06 ± 1,45	3,70 ± 1,08	3,58 ± 1,06 ^{b**}	<0,01
HDL-H (mmol/L)	1,27 ± 0,41	1,36 ± 0,38	1,52 ± 0,39 ^{b*}	<0,01
TG (mmol/L) #	1,72 (1,48-2,01)	1,78 (1,43-2,21)	1,28 (1,17-1,40) ^{b, c*}	<0,05
Doza prednizolona (mg) ¥	5 (5-10)	10 (8,75-10)	/	<0,05^e
Trajanje terapije (meseći) ¥	24 (12-36)	24 (12-48)	/	0,737 ^e

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (ako nije drugačije naznačeno); # podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti; ¥ podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon; a - Anova test(ako nije drugačije naznačeno); b - Značajno različit u odnosu na plućnu manifestaciju bolesti (*Tukey post-hoc test*); c - Značajno različit u odnosu na kombinovanu plućnu i vanplućnu manifestaciju bolesti (*Tukey post-hoc test*); d - Studentov t-test; e – MannWhitney test; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Rezultati prikazani u Tabeli 37 ukazuju da su koncentracije ukupnih proteina, albumina, SAA, UH i TG značajno veće u obema grupama pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.

Koncentracija glukoze i LDL-H je bila značajno viša, a koncentracija HDL-H je bila značajno manja kod plućne bolesti kad se porede sa zdravim ispitanicima. Koncentracije hsCRP-a, aktivnost ACE, kao i trajanje terapije se nisu značajno razlikovali između svih grupa. Očekivano, doza primenjenog leka je bila značajno veća kod kombinovane plućne i vanplućne lokalizacije u poređenju sa isključivo plućnom sarkoidozom.

U Tabelama 38 i 39 prikazani su rezultati koji se tiču distribucije LDL i HDL subklasa, oksidativno-stresnog statusa i PON1 statusa u kontrolnoj grupi, grupi pacijenata sa plućnom i grupi sa plućnom i vanplućnom sarkoidozom.

Tabela 38. Distribucija LDL i HDL subklasa u kontrolnoj grupi, grupi pacijenata sa plućnom i grupi sa plućnom i vanplućnom lokalizacijom sarkoidoze

Parametar	Plućna sarkoidoza	Plućna i vanplućna sarkoidoza	Kontrolna grupa	P ^a
Dominantni LDL dijametar (nm)	27,2 ± 1,1	27,1 ± 1,0	27,0 ± 1,7	0,795
LDL I (%)	23,0 ± 4,7	21,5 ± 5,3	36,9 ± 8,3 ^{b, c***}	<0,001
LDL II (%)	25,3 ± 3,9	23,9 ± 3,8	12,2 ± 2,9 ^{b, c***}	<0,001
LDLIII (%)	20,5 ± 2,7	20,1 ± 3,1	16,5 ± 4,1 ^{b, c***}	<0,001
LDL IVA (%)	12,5 ± 2,5	12,9 ± 2,2	11,3 ± 2,9 ^{b, c*}	<0,01
LDL IVB (%)	18,6 ± 3,6	21,6 ± 6,9	23,0 ± 6,3 ^{b***}	<0,001
LDL IV (%)	31,1 ± 4,3	34,5 ± 6,7	34,3 ± 8,2 ^{b*}	<0,05
Male, guste LDL čestice (%)	51,6 ± 5,6	54,6 ± 7,1	50,9 ± 8,3	0,094
Dominantni HDL dijametar (nm)	9,6 ± 1,2	9,6 ± 1,1	10,4 ± 1,1 ^{b***, c**}	<0,001
HDL 2b (%)	41,3 ± 9,2	43,0 ± 9,5	43,2 ± 7,2	0,432
HDL 2a (%)	20,7 ± 2,7	21,6 ± 1,6	19,4 ± 4,5 ^{c*}	<0,05
HDL 3a (%)	15,8 ± 3,4	15,7 ± 3,5	14,2 ± 3,2 ^{b*}	<0,05
HDL 3b (%)	10,0 ± 3,9	9,0 ± 3,8	9,8 ± 2,9	0,499
HDL 3c (%)	11,6 ± 6,5	10,6 ± 5,9	12,9 ± 5,7	0,217
male HDL čestice (%)	37,4 ± 8,9	35,3 ± 10,0	36,9 ± 8,8	0,645

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija; a - Anova test; b - Značajno različit u odnosu na plućnu manifestaciju bolesti (*Tukey post-hoc test*); c - Značajno različit u odnosu na kombinovanu plućnu i vanplućnu manifestaciju bolesti (*Tukey post-hoc test*); *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Rezultati pokazuju da su relativne proporcije LDL II, LDL III i LDL IVA značajno više, a relativne proporcije LDL I i dominantni HDL dijametar značajno manje u obema grupama pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Relativne proporcije HDL 3a su bile značajno više, dok su relativne proporcije LDL IVB i LDL IV bili značajno niže kod pacijenata sa plućnom manifestacijom sarkoidoze u poređenju sa kontrolnom grupom. Relativna proporcija HDL 2a je bila značajno veća u kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj bolesti prema kontrolnoj grupi.

Tabela 39. Oksidativno-stresni status i PON1 status u kontrolnoj grupi, grupi pacijenata sa plućnom i grupi sa plućnom i vanplućnom lokalizacijom sarkoidoze

Parametar	Plućna sarkoidoza	Plućna vanplućna sarkoidoza	Kontrolna grupa	P ^a
S-TOS (μmol/L) #	16,10 (13,10-19,78)	7,77 (6,08-9,93)	4,33 (3,83-4,88) ^{b**, c**}	<0,001
S-MDA (μmol/L) #	1,19 (1,11-1,28)	1,13 (0,99-1,30)	0,74 (0,67-0,81) ^{b, c***}	<0,001
S-PAB (HK units)	95,5 ± 36,6	83,5 ± 44,2	63,2 ± 36,4 ^{b*}	<0,05
S- SH grupe (mmol/L)	0,467 ± 0,147	0,444 ± 0,142	0,514 ± 0,109 ^{b, c**}	<0,01
S- TAS (μmol/L) #	955 (868-1039)	951 (900-1002)	1126 (1096-1157) ^{b, c**}	<0,01
S- SOD (U/L) ¥	19,0 (13,0-25,2)	18,0 (12,0-23,0)	96,0 (36,7-125,0) ^{e, f***}	<0,001^d
H-MDA (μmol/gHb)	0,167 ± 0,061	0,156 ± 0,058	0,097 ± 0,055 ^{b****, c*}	<0,001
H-SOD (U/gHb)	5,25 ± 2,65	4,84 ± 3,19	7,14 ± 5,57	0,087
H-O ₂ ⁻ (μmol/min/gHb) #	11,5 (9,5-12,7)	11,4 (10,1-13,6)	8,2 (7,4-9,1) ^{b, c***}	<0,001
H-TOS (μmol/gHb) #	7,6 (6,5-9,1)	8,1 (6,6-9,5)	6,6 (5,8-7,6)	0,141
H-SH grupe (mmol/gHb) ¥	0,442 (0,225-1,124)	0,487 (0,212-1,127)	0,220 (0,140-0,350) ^{e, f***}	<0,001
POaza (U/L) #	310 (219-439)	172 (122-245) ^{b*}	475 (404-559) ^{b*, c*}	<0,05
DZOaza (U/L)	12648 ± 4760	15070 ± 4220	15088 ± 4457 ^{b*}	<0,05

Podaci su prikazani kao srednja i standardna devijacija (ako nije drugačije naznačeno); # podaci su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti; ¥ podaci su prikazani kao medijana i interkvartilni raspon; a - Anova test (ako nije drugačije naznačeno); b - Značajno različit u odnosu na plućnu manifestaciju bolesti (*Tukey post-hoc* test); c - Značajno različit u odnosu na kombinovanu plućnu i vanplućnu manifestaciju bolesti (*Tukey post-hoc* test); d - Kruskal Wallis test; e - Značajno različit u odnosu na plućnu manifestaciju bolesti (*MannWhitney* test); f - Značajno različit u odnosu na kombinovanu plućnu i vanplućnu manifestaciju bolesti (*MannWhitney* test); S-serum; H-hemolizat eritrocita; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Aktivnost POaze bila je značajno niža u kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj sarkoidozi u odnosu na isključivo plućnu manifestaciju. Dobijeni rezultati dalje pokazuju da su koncentracije serumskog TOS-a, MDA, eritrocitnog MDA, O_2^- značajno više, a koncentracija serumskih SH grupa, TAS-a, aktivnost serumskog SOD i POaze značajno manje u obema grupama pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija PAB-a je bila značajno viša, a aktivnost DZOaze je bila značajno niža kod pacijenata sa plućnom manifestacijom sarkoidoze u poređenju sa kontrolnom grupom.

4.7.2. Korelacije parametara inflamacije, lipidnog, oksidativno-stresnog i PON1 statusa u izolovanoj plućnoj i plućnoj sarkoidozi sa vanplućnim manifestacijama

Rezultati su pokazali da inflamatorni markeri nisu bili u značajnim korelacijama sa ostalim ispitivanim parametrima. Zato su predstavljene samo korelacije koje veličina i raspodela LDL i HDL subfrakcija ostvaruju sa osnovnim parametrima lipidnog statusa, parametrima oksidativno-stresnog, inflamatornog i PON1 statusa u plućnoj i kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj bolesti. U plućnoj sarkoidozi, proporcija LDL IVA korelira pozitivno sa UH ($\rho= 0,308$; $P=0,047$), kao i proporcija LDL IVB sa MDA ($\rho= 0,296$; $P=0,031$).

U Tabeli 40 date su korelacije veličina i raspodela HDL subfrakcija sa inflamatornim, lipidnim, parametrima oksidativno-stresnog i PON1 statusa u izolovanoj plućnoj sarkoidozi.

Tabela 40. Spearman-ova korelaciona analiza veličine i raspodele HDL subfrakcija sa inflamatornim, lipidnim, parametrima oksidativno-stresnog i PON1 statusa u plućnoj sarkoidozi

Parametar	HDL dij (nm)	HDL 2b (%)	HDL 2a (%)	HDL 3a (%)	HDL 3b (%)	HDL 3c (%)	male HDL (%)
UH (mmol/L)	0,086	-0,301*	0,161	-0,168	-0,092	-0,341*	-0,352*
HDL-H (mmol/L)	0,154	0,179	0,420*	0,003	-0,221	-0,314	-0,335
LDL-H (mmol/L)	-0,062	0,478**	0,238	-0,076	-0,116	-0,504**	-0,449*
TG (mmol/L)	-0,006	0,070	-0,155	-0,351*	0,126	0,189	0,087
ACE (U/L)	-0,064	-0,091	0,211	-0,252	0,018	0,379	0,122
hsCRP (mg/L)	-0,310	-0,515	0,457	0,183	0,530	0,497	0,462
SAA (µg/L)	-0,294	-0,205	0,295	0,325	-0,005	-0,010	0,082
S-TAS (µmol/L)	-0,056	-0,547***	-0,054	0,143	0,304*	0,462**	0,486**
S-TOS (µmol/L)	0,116	-0,317*	-0,064	-0,077	0,197	0,295*	0,295*
S-SH grupe (mmol/L)	0,204	0,433**	-0,109	-0,234	-0,075	-0,306*	-0,343*
S-SOD (U/L)	0,308	0,031	-0,127	-0,060	0,162	-0,082	-0,011
MDA (µmol/L)	-0,150	-0,283*	0,043	-0,111	0,039	0,383**	0,304*
PAB (HK jed)	0,261	-0,173	0,125	-0,143	0,122	0,206	0,149
H-TOS (µmol/gHb)	-0,101	-0,117	0,056	0,367*	0,156	0,298*	0,275*
H-SH grupe (mmol/gHb)	0,090	0,105	0,257*	0,105	0,055	-0,014	-0,057
H-SOD (U/gHb)	0,124	0,068	0,135	-0,069	0,010	-0,123	0,078
H-MDA (µmol/gHb)	-0,046	-0,056	0,179	-0,348*	-0,268	0,213	0,290*
POaza (U/L)	-0,103	0,459*	0,522*	-0,062	-0,267	-0,439*	-0,405*
DZOaza (U/L)	0,323	0,252	0,000	-0,237	0,038	-0,287	-0,227

S-serum; H-hemolizat eritrocita; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Spearmanova korelaciona analiza je pokazala da se u značajnoj pozitivnoj korelaciji nalaze proporcija HDL 2b i koncentracije LDL-H, serumskog TAS-a i SH grupa, aktivnosti POaze; proporcija HDL 2a i koncentracije HDL-H, eritrocitnih SH grupa i POazne aktivnosti; proporcija HDL 3a i eritrocitnih TOS-a; proporcija HDL 3b i koncentracija serumskog TAS-a; proporcija HDL 3c i koncentracije serumskog TAS-a, TOS-a, MDA i eritrocitnog TOS-a; proporcija ss HDL i serumski TAS, TOS, MDA i eritrocitni TOS. Značajne negativne korelacije su dobijene između proporcija HDL 2b i koncentracija UH, serumskog TOS-a, MDA; proporcija HDL 3a i koncentracije TG i eritrocitnog MDA; proporcija HDL 3c i koncentracije UH, LDL-H, serumskih SH grupa i POazne aktivnosti; proporcija malih HDL i koncentracije UH, LDL-H i serumskih SH grupa i POazne aktivnosti.

U kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj sarkoidozi, proporcija LDL I se nalazi u značajnoj negativnoj korelaciji sa MDA ($\rho = -0,433$; $P = 0,039$) dok se proporcije LDL IVA ($\rho = 0,536$; $P = 0,008$) i udeo malih, gustih LDL čestica nalaze u pozitivnoj korelaciji sa istim parametrom ($\rho = 0,415$; $P = 0,049$). Značajna pozitivna korelacija je utvrđena uočena između proporcije LDL IVA i nivoa hsCRP-a ($\rho = 0,807$; $P = 0,028$).

Rezultati Spearmanove korelacione analize veličine i raspodele HDL subfrakcija u kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj bolesti prikazani su u Tabeli 41.

Tabela 41. Spearman-ova korelaciona analiza veličine i raspodele HDL subfrakcija sa inflamatornim, lipidnim, parametrima oksidativno-stresnog i PON1 statusa u kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj sarkoidozi

Parametar	HDL dij (nm)	HDL 2b (%)	HDL 2a (%)	HDL 3a (%)	HDL 3b (%)	HDL 3c (%)	male HDL (%)
UH (mmol/L)	0,046	-0,182	-0,138	0,286	0,059	0,125	0,195
HDL-H (mmol/L)	-0,569	0,196	-0,092	0,675*	0,150	-0,563	-0,173
LDL-H (mmol/L)	0,078	-0,336	-0,441	0,538	0,556	-0,048	0,429
TG (mmol/L)	-0,096	-0,409	0,130	0,235	0,007	0,497*	0,363
ACE (U/L)	-0,124	0,035	0,082	0,324	-0,049	-0,148	-0,052
hsCRP (mg/L)	-0,470	0,055	-0,796*	0,582	0,197	-0,015	0,141
SAA (ng/mL)	0,180	0,309	0,065	-0,334	-0,215	-0,155	-0,315
S-TAS (μ mol/L)	0,357	-0,326	-0,281	0,119	0,312	0,335	0,356
S-TOS (μ mol/L)	0,301	-0,246	-0,096	0,101	0,216	0,225	0,249
S-SH grupe (mmol/L)	0,072	0,407	0,056	-0,240	-0,444*	-0,248	-0,394
S-SOD (U/L)	-0,189	-0,110	-0,040	-0,121	0,105	0,197	0,111
MDA (μ mol/L)	0,013	-0,545**	-0,171	0,185	0,211	0,692***	0,547**
PAB (HK jed)	-0,008	-0,341	-0,029	0,261	0,293	0,216	0,329
H-TOS (μ mol/gHb)	-0,134	-0,075	0,023	0,189	0,202	0,121	0,152
H-SH grupe (mmol/gHb)	0,231	0,124	0,167	-0,078	-0,106	-0,163	-0,041
H-SOD (U/gHb)	0,089	0,034	0,146	-0,092	-0,021	0,008	0,007
H-MDA (μ mol/gHb)	-0,157	-0,142	0,079	0,173	0,123	0,235	0,212
POaza (U/L)	0,029	0,038	0,071	0,376	-0,178	-0,247	-0,049
DZOaza (U/L)	-0,162*	0,265	0,557	-0,060	-0,630	-0,011	-0,354

S-serum; H-hemolizat eritrocita; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Rezultati prikazani u Tabeli 41 pokazuju da značajna pozitivna korelacija postoji između proporcija HDL 3a i koncentracije HDL-H; proporcija HDL 3c i koncentracije TG i serumskog MDA; proporcija malih HDL i koncentracije MDA. Značajne negativne korelacije se mogu uočiti između proporcija HDL 2b i koncentracije MDA; proporcije HDL 2a i koncentracije hsCRP-a; proporcije HDL 3b i koncentracije serumskih SH grupa.

4.7.3. Ispitivanje nezavisnog uticaja oksidativno-stresnog statusa i doze leka na proporciju malih, gustih HDL subfrakcija u plućnoj sarkoidozi

Kako su prethodne korelacione analize pokazale značajnu povezanost serumskih parametara oksidativno-stresnog statusa na distribuciju malih HDL čestica u izolovanoj plućnoj sarkoidozi, dalje smo ispitivali nezavistan uticaj tih parametara na raspodelu pomenutih čestica. Rezultati su prikazani u Tabeli 42.

Tabela 42. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja godina, pola, oksidativno-stresnog statusa i doze leka na distribuciju ss HDL u plućnoj sarkoidozi

Male guste HDL (%) (adj. $R^2 = 0,478$)*		
Parametar	β	P
Starost (godine)	-0,245	0,349
Pol	-0,033	0,895
S-TOS ($\mu\text{mol/L}$)	0,832	0,043
S-MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0,142	0,550
S-PAB (HK jed)	-0,200	0,503
S-SH grupe (mmol/L)	-0,442	0,147
POaza (U/L)	-1,038	0,022
Doza leka (mg)	0,288	0,296

*Model je uključio parametre čija je P vrednost za Spearmanov koeficijent korelacije bila $\leq 0,1$ plus godine starosti, pol i dozu leka

U ispitivani model uključeni su još i godine starosti, pol i doza primenjenog leka jer se ona značajno razlikovala između pacijenata sa isključivo plućnom u odnosu na pacijente sa kombinovanom plućnom i vanplućnom bolešću. Rezultati multiple regresione analize dati su u Tabeli 42 i pokazuju da kada se godine, pol, serumski oksidativno-stresni status i POazna aktivnost PON1 uključe u model kao nezavisne promenljive, koncentracija TOS-a i PON1 aktivnost imaju značajan nezavistan uticaj na promene u distribuciji malih HDL čestica. Ovom analizom je utvrđeno da čak 47,8% varijacija u distribuciji malih HDL čestica može da se objasni povećanjem u koncentraciji TOS-a i sniženjem PON1 aktivnosti.

5. DISKUSIJA

Poznato je da je sarkoidoza inflamatorno oboljenje i u različitim studijama opisane su povećane koncentracije inflamatornih markera, kao što su hsCRP (25, 33, 124), ACE (2, 25, 33), SAA (25, 35, 36) u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati naše studije potvrdili su nalaze pomenutih studija u pogledu značajno većih koncentracija hsCRP-a i SAA kod pacijenata sa sarkoidozom u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 6). Aktivnost ACE je bio visok u grupi pacijenata i to blizu gornje granice referentnog intervala (Tabela 6), ali kako ovaj parameter nije određen u grupi zdravih osoba, nismo imali poređenje između ove dve ispitivane grupe. Visoke vrednosti parametara inflamacije, kao što su SAA i ACE, mogu da ukažu na aktivnost granuloma. Kao što je prethodno navedeno, povišena koncentracija SAA može biti posledica povećane produkcije proinflamatornih citokina koji stimulišu produkciju ovog proteina u jetri (33) ili aktiviranih imunskih ćelija u granulomima koje pojačano stvaraju SAA (13). Aktivirane ćelije imunskog sistema produkuju i druge proinflamatorne medijatore (2, 13) koji dalje stimulišu sintezu proteina pozitivnih reaktanata akutne faze u jetri, pa se tako može objasniti i visoka vrednost hsCRP-a (25, 34).

U sarkoidozi se očekuje da se hronični tok oboljenja i kombinovane plućna i vanplućna manifestacija karakterišu većim stepenom inflamacije i da su teži oblici u odnosu na akutnu bolest i izolovanu plućnu bolest (2, 29, 33). Ipak, dobijeni rezultati pokazuju da je SAA i u akutnoj i u hroničnoj (Tabela 31), kao i u izolovanoj plućnoj i kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj bolesti značajno veći u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 37), dok su vrednosti hsCRP-a značajno veće u akutnoj i u hroničnoj bolesti u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 31), a značajno veće samo u plućnoj sarkoidozi u poređenju sa zdravim ispitanicima (Tabela 37). HsCRP, SAA i ACE se ne razlikuju značajno između akutne i hronične (Tabela 31), kao ni između plućne i kombinovane plućne i vanplućne sarkoidoze (Tabela 37). Dobijeni rezultati idu u prilog već pomenutoj tvrdnji da se pacijenti nalaze u stanju inflamacije, a kako su efekti kortikosteroida i imunosupresivnih lekova na inflamaciju poznati (125), ovakvo odsustvo značajne razlike između različitih tokova i manifestacija bolesti može da se pripíše tretmanima na kojima se pacijenti nalaze. Treba naglasiti da je razlika za SAA izraženija nego razlika dobijena za hsCRP (između kombinovane plućne i vanplućne manifestacije i kontrolne grupe i nije bilo značajne razlike za ovaj parametar – Tabela 37) što dodatno ukazuje na specifični

značaj koji SAA ima u patogenezi sarkoidoze (13, 35). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima publikovanim u studiji Yamada i saradnika (126) koji su pokazali da kortikosteroidi smanjuju nivo inflamacije uz sniženje hsCRP-a, ali nivo SAA može da ostane visok zbog niske osetljivostivog proteina na ovu grupu lekova. Kortikosteroidi deluju tako što se vezuju za svoje receptore koji se nalaze u citoplazmi ćelije kada dolazi do transfera kompleksa lek-receptor u nukleus. U nukleusu, ovaj kompleks dovodi do aktivacije enzima histon-deacetilaze-2 koja zatim deluje inhibitorno na transkripciju različitih proinflamatornih gena (125, 127). Međutim, sinteza SAA nije dovoljno suprimirana dejstvom kortikosteroida i njegova koncentracija može da ostane visoka naročito usled primene niže doze leka.

Inflamatorni procesi u plućnom tkivu zahvaćenom bolešću dovode do slabljenja plućne funkcije koja je u različitim studijama procenjivana merenjem parametara FEV₁, FVC i DLCO (36, 50). Pomenuti parametri plućne funkcije nisu određeni u našoj kontrolnoj grupi. Ipak, u radu Bargaglija i saradnika (36) kao opsezi vrednosti koji su prisutni kod zdravih osoba su sledeći (izraženi kao srednja vrednost ± stand devijacija): za FEV₁ 98,6 ± 20,5 %; za FVC 99,5 ± 10,2 %; za DLCO 98,8 ± 17,7 %. Kao zdravi ispitanici izabrane su osobe bele rase, a kao kriterijum za ušesće u ovoj studiji su bili odsustvo astme, alergije ili bilo koje druge bolesti tokom 12 meseci pre uključenja u studiju. Studija Boots i saradnika (50) navodi za sve parametre plućne funkcije vrednosti od 90 do 110 % kod zdravih ispitanika nepušača koji nisu uzimali vitamine ili neke druge dodatke ishrani. Može se videti da su rezultati dobijeni kod naših pacijenata niži (Tabela 4) u odnosu na vrednosti kod zdravih osoba navedenim u drugim studijama i zato možemo da pretpostavimo da uočena povećana inflamacija može dodatno da ugrozi plućnu funkciju.

Rezultati naše studije pokazuju značajno veći nivo O₂⁻ u eritrocitima pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 13 i Slika 15), a koji može da se objasni činjenicom da ćelije imunskog sistema u tkivima zahvaćenim inflamatornim procesima stvaraju visoke koncentracije činilaca oksidativnog stresa koji se oslobađaju u cirkulaciju i bivaju preuzete pomoću odgovarajućih kanala na membrani eritrocita (128). Ovakav transport verovatno dovodi do povećane akumulacije O₂⁻ u eritrocitima pacijenata. O₂⁻ radikal podleže dizmutaciji do H₂O₂ koji čini deo TOS-a (43), a pomoću enzima SOD (38). Značajno veća koncentracija TOS-a u serumu i eritrocitima je dobijena kod grupe pacijenata u poređenju sa zdravim osobama (Tabele 10 i 13 i

Slike 12 i 15) i ovakav nalaz je u skladu sa rezultatima drugih studija (40). Poznato je i da $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 mogu da učestvuju u stvaranju lipidnih hidroperoksida, drugog važnog činioca TOS-a čija se produkcija povećava u patološkim stanjima (40). Dalja oksidativna modifikacija dovodi do produkcije MDA kao produkta razgradnje lipidnih hidroperoksida i markera kasne faze peroksidativnih procesa na lipidima (41) koji je takođe značajno povišen i u serumu i u eritrocitima pacijenata u poređenju sa rezultatima dobijenim za kontrolnu grupu (Tabele 10 i 13 i Slike 12 i 15). Povećan nivo MDA zabeležen je i u drugim studijama koje su se bavile oksidativnim stresom urazličitim patološkim stanjima kao što su koronarna arterijska bolest i Alchajmerova bolest (41, 129). Naši rezultati pokazuju i postojanje značajne pozitivne korelacije između parametara inflamacije i serumskih i eritrocitnih oksidanasa u grupi pacijenata: S-MDA i PAB sa ACE i hsCRP, S-TOS sa ACE, H-MDA sa ACE (Tabela 15). Kako slični rezultati nisu nađeni i u kontrolnoj grupi (Tabela 14), ovim može da se potvrdi značajan uticaj povećanog stepena inflamacije na oksidativni stres, a čija je povezanost dokumentovana i u drugim radovima (38, 45, 50).

Sistem antioksidativne zaštite se sastoji od enzimskih i neenzimskih antioksidanasa (46). Kao meru neenzimske zaštite, u našoj studiji su u serumu određeni TAS (koji pretežno potiče od proteinskih SH grupa, mokraćne kiseline i vitamina C) i koncentracija ukupnih SH grupa koji su bili značajno niži u grupi pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 10 i Slika 12). Rezultati studija drugih autora koji su ispitali oksidativni stres u plućnim bolestima dokumentuju značajno snižene koncentracije vitamina C, mokraćne kiseline i GSH u sarkoidozi (50), alii smanjenje neenzimskog antioksidativnog kapaciteta u hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća, akutnom respiratornom distres sindromu i cističnoj fibrozi (130), kao i snižen nivo vitamina C u astmi (54). Koncentracija SH grupa u eritrocitima (Tabela 13 i Slika 15) je bila značajno viša kod pacijenata, što bi se moglo pripisati povećanom nivou GSH kao kompenzatornom odgovoru na povećani oksidativni stres u eritrocitima. U tom slučaju, mogla bi se očekivati povećana aktivnost enzima glutation reduktaze (GR) i dovoljna koncentracija NADPH koji bi održali GSH u redukovanom obliku. Publikacija Rothkrantz-Kos i saradnika (55) opisuje smanjenje nivoa NADPH u eritrocitima pacijenata sa sarkoidozom, a razlog za to bi možda mogao da se pripiše utrošku ovog kofaktora u reakciji koju katalizuje GR da bi se održao visok nivo GSH.

Niska aktivnost SOD u serumu, izmerena kod naših pacijenata sa sarkoidozom, (Tabela 10 i Slika 12) može da bude posledica nishodne regulacije transkripcije gena za ekstracelularnu SOD (EC-SOD) što je opisano u nekim difuznim plućnim bolestima (46) i u astmi (131). Međutim, ovakve promene u aktivnosti SOD-a pod uticajem oksidativnog stresa nisu zabeležene u drugim studijama (38). Cu,ZnSOD je intracelularna izoforma enzima koja podleže inaktivaciji usled delovanja H_2O_2 (38). Kako H_2O_2 ulazi u sastav TOS-a koji je povećan u našoj studiji, može da se očekuje i snižena aktivnost ove izoforme SOD-a u eritrocitima (Tabela 13 i Slika 15).

Naši rezultati pokazuju da je koncentracija PAB-a bila značajno veća kod pacijenata odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 10 i Slika 12). Povećan nivo PAB-a se može objasniti činjenicom da ovaj parametar pokazuje koncentraciju H_2O_2 u antioksidativnom okruženju, a do sad je utvrđeno da se pacijenti sa sarkoidozom nalaze u stanju povećanog oksidativnog stresa i smanjene antioksidativne zaštite. Treba napomenuti i da su slični nalazi publikovani u radovima koji se tiču koronarne arterijske bolesti (48) i dijabetes melitusa tipa 2 (49), patološkim stanjima koji se takođe karakterišu disbalansom u nivoima oksidanasa i antioksidanasa (41, 132).

Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu i eritrocitima u akutnom i hroničnom toku bolesti značajno su se razlikovali samo u poređenju sa kontrolnom grupom, dok značajne razlike između same akutne i hronične bolesti nisu zabeležene (Tabela 33). Pomenuti parametri u izolovanoj plućnoj i kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj sarkoidozi se takođe razlikuju značajno samo u odnosu na zdrave osobe (Tabela 39). Međutim, treba naglasiti da je koncentracija PAB-a bila značajno viša u plućnoj bolesti u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovakav rezultat za PAB bi mogao da se objasni primenom značajno niže doze prednizolona u izolovanoj plućnoj bolesti u odnosu na kombinovanu plućnu i vanplućnu lokalizaciju (Tabela 37). Efekat ovog leka na oksidativni stres bi mogao da se očekuje pošto su inflamatorni i redoks procesi povezani (38, 133, 134). Ipak, niža doza, primenjena u ovom slučaju, očigledno nije mogla da dovede do značajnog smanjenja oksidativnog stresa.

Kako su se naši parametri oksidativno-stresnog statusa u serumu i eritrocitima uglavnom značajno razlikovali između pacijenata i zdravih osoba, postavljen je cilj da se ispita koliko ovi parametri mogu da predvide prisustvo bolesti ili da pokažu kakva je dijagnostička tačnost u razlikovanju pacijenata od zdravih ispitanika. Rezultati su pokazali da su serumski i eritrocitni MDA najbolji prediktori oboljenja u poređenju sa drugim parametrima oksidativno-

stresnog statusa (Tabela 16). U multivarijantnoj regresionoj analizi, H-MDA je zadržao značajnu prediktivnu sposobnost nakon podešavanja (engl. *adjustment*) za ostale parametre oksidativno-stresnog statusa iz eritrocita, kao i nakon korekcije za lipidne parametre. Vrednost OR za S-MDA je opala nakon što su uzete u obzir koncentracije parametara oksidativno-stresnog i lipidnog statusa, ali je ovaj parametar i dalje bio značajno povezan sa prisustvom bolesti (Tabela 17). Kako su procesi lipidne peroksidacije povezani sa stvaranjem fibroznog tkiva (135), a sarkoidoza je bolest u čijem krajnjem stadijumu se nalazi fibroza (2), time bi se mogao objasniti značaj određivanja MDA u predviđanju bolesti. Značajna povezanost MDA sa prisustvom bolesti je dokumentovana i u drugim studijama (136). Utvrđeno je da činioci oksidativnog stresa mogu da stimulišu ekspresiju gena za kolagen, proteina koji učestvuje u nastanku fibroznog ožiljnog tkiva (137). MDA i 4-hidroksinonenalsu poznati i kao proinflamatorni medijatori koji dovode do aktivacije hepatičnih stelatnih ćelija koje onda u većoj meri stvaraju kolagen (138).

U analizi dijagnostičke tačnosti ispitivanih parametara, modeli sačinjeni od različitih oksidanasa i/ili antioksidanasa imali su bolji potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od zdravih ispitanika u odnosu na pojedinačne parametre (Tabele 18 i 19, Slika 16). Modeli u koje su uključeni serumski antioksidansi; zatim kombinovani serumski oksidansi i antioksidansi i kombinovani eritrocitni oksidansi i antioksidansi pokazali su izvanrednu dijagnostičku tačnost dok se model koji sadrži serumske lipidne parametre odlikuje odličnom tačnošću. Opisani rezultati ukazuju da parametri oksidativno-stresnog statusa ipak imaju nešto bolji diskriminatorski potencijal u odnosu na lipidne parametre. Do sada je proučavan dijagnostički značaj parametara inflamacije (33) i naša studija je prva koja je ukazala na dijagnostički značaj parametara oksidativnog stresa i lipidnog statusa koji su takođe uključeni u patogenezu sarkoidoze.

Pošto je poznato da inflamacija može da utiče na lipidni status tako što dovodi do promena u metabolizmu čestica bogatih trigliceridima (56) ili smanjuje kapacitet HDL čestica u efluksu holesterola (57), dislipidemija koja se uočava u našoj grupi pacijenata je očekivana. Naši rezultati pokazuju značajno veću koncentraciju UH i TG, kao i aterogenog indeksa TG/HDL-H i značajno manju koncentraciju HDL-H u grupi pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Takođe, procentualna zastupljenost ispitanika sa hipertrigliceridemijom je bila značajno viša dok je zastupljenost osoba sa niskom koncentracijom HDL-H bila značajno niža u grupi sa sarkoidozom (Tabela 5). Sličan rezultat je dobijen i u studiji Kindman-a i saradnika (58) gde je utvrđeno

značajno smanjenje UH i HDL-H dok se u radu Salazar-a i saradnika (59) promena u lipidnom profilu u sarkoidozi ogledala u značajnom smanjenju koncentracije HDL-H. Smatra se da opisano smanjenje koncentracije HDL-H potiče primarno od smanjenja sadržaja holesterola u većim HDL 2 subfrakcijama (59). Porast SAA, koji je utvrđen u našoj studiji, može biti praćen smanjenom sintezom apoA-I. Ovi procesi mogu biti posledica uticaja proinflammatoryh citokina koji istovremeno povećavaju ekspresiju SAA i snižavaju ekspresiju apoA-I (109). SAA takođe može direktno da zameni apoA-I koji je ugrađen u česticu HDL-a (110, 139). Proinflammatory citokini mogu da dovedu do sniženja aktivnosti lipoproteinske lipaze (110). Moglo bi se pretpostaviti da je jedan od mogućih razloga povećane koncentracije TG kod naših pacijenata upravo snižena aktivnost ovog enzima, što bi trebalo proveriti određivanjem aktivnosti lipoproteinske lipaze u plazmi posle davanja heparina.

Podaci dobijeni u našoj studiji govore i o značajnoj pozitivnoj korelaciji u grupi pacijenata između koncentracije HDL-H i parametara antioksidativne zaštite, kao i koncentracije TG i LDL-H sa markerima oksidativnog stresa (Tabela 15). Ovakvi podaci sugerišu da veća koncentracija serumskih i eritrocitnih antioksidanasa može da sačuva komponente HDL-a od oksidacije i posledičnog katabolizma (140). Iako se naša studija nije bavila razmatranjem funkcionalnosti HDL čestica u sarkoidozi, može se pretpostaviti da su, usled povećanog oksidativnog stresa i smanjene antioksidativne zaštite, ove karakteristike HDL čestica urušene. Naši rezultati takođe upućuju i na to da su povećani nivoi TG i LDL-H često praćeni i povećanim nivoom oksidanasa. Poremećaj u metabolizmu lipoproteinskih čestica, uzrokovan prevashodno inflamatornim procesima u sarkoidozi, može da produži njihov poluživot u cirkulaciji pri čemu se one (a naročito LDL) više izlažu ROS-u (41). Ovo predstavlja jedan od potencijalnih mehanizama kojim bi se mogla objasniti pozitivna asocijacija između LDL-H, TG i oksidanasa.

Naša studija je među prvim studijama u kojoj su ispitivane promene u profilu LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa sarkoidozom, a ukazuje na promene u njihovoj distribuciji (Tabela 20). Rezultati pokazuju značajno veći procentualni udeo HDL 2a i HDL 3a subfrakcija, kao i značajno niži dominantni HDL dijametar kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. U publikaciji Salazara i saradnika (59) navodi se porast relativne proporcije HDL 3 čestica kroz odnos HDL-3-H/HDL-H u odnosu na kontrolu čime može da se potvrdi promena u

metabolizmu HDL čestica koja je dobijena i u našoj grupi pacijenata. Naši pacijenti se odlikuju i značajno povećanim relativnim udelom LDL II i LDL III čestica i sniženim udelom LDL I čestica. Objašnjenje za ovakve promene u metabolizmu LDL i HDL čestica, odnosno porast u zastupljenosti manjih LDL i HDL čestica moglo bi da se nađe u hipertrigliceridemiji koja je takođe prisutna kod pacijenata sa sarkoidozom (Tabela 5). Kao što je ranije pomenuto, inflamatorni procesi prisutni u bolesti mogu da utiču na metabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima, što onda dalje doprinosi nastanku manjih LDL i HDL čestica (56). Smatra se da SAA, koji je kod naših pacijenata značajno povišen, deluje inhibitorno na enzim LCAT čime je onemogućena maturacija HDL čestica (59). Sem toga, enzim LCAT može da bude inhibiran i dejstvom oksidativnih činilaca (76, 141). Različite studije ukazuju i na to da oksidativni stres može da dovede do narušavanja strukturnih i funkcionalnih karakteristika HDL čestica delujući ne samo na LCAT nego i na druge proteine i lipide HDL (75), kao i LDL čestica (142). Slične promene u profilu lipoproteinskih subfrakcija su nađene i u drugim inflamatornim bolestima (85, 143, 144). Jedno novije istraživanje govori o preklapanju genskih lokusa za proteine koji regulišu sintezu lipida i funkcije imunskog sistema u različitim bolestima među kojima je i sarkoidoza (84). Na ovaj način se dodatno potvrđuje povezanost inflamatornih procesa i metabolizma LDL i HDL subfrakcija.

Značajno je pomenuti i da je koncentracija HDL-H bila značajno niža u hroničnoj bolesti u odnosu kontrolnu grupu, dok takva razlika nije uočena između akutne bolesti i kontrolne grupe (Tabela 31). Naši pacijenti sa hroničnim tokom sarkoidoze su imali i značajno veći udeo HDL 3a subfrakcija dok su oni sa akutnim tokom imali značajno veći relativni udeo HDL 2a subfrakcija u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 32). Ovakvi rezultati ukazuju da su bolest i njeno trajanje značajni činioci koji doprinose smanjenju veličine HDL čestica, kao i koncentracije HDL-H. Kako je kod hroničnog toka sarkoidoze, trajanje terapije duže u odnosu na vreme navedeno u prethodno publikovanoj studiji Salazar-a i saradnika (60), moguće je da dugotrajna primena ovih lekova može ispoljiti uticaj na LDL i HDL čestice. Treba pomenuti da rezultati multiple linearne regresione analize ukazuju da su male HDL 3a i HDL 3c subfrakcije nezavisno povezane sa hroničnom sarkoidozom, čak i kad se kao varijabla uključi trajanje terapije (Tabela 36). Ovakvi rezultati pokazuju da asocijacije između parametara inflamacije i drugih parametara u različitim tokovima bolesti nisu jasno izdiferencirane, što može biti

posledica primenjene terapije. Ipak, veza između hroničnog toka bolesti i malih HDL čestica je ostala značajna i verovatno može da se pripíše kako samoj bolesti, tako i trajanju terapije.

Izolovana plućna sarkoidoza se karakteriše značajno nižim koncentracijama HDL-H (Tabela 37), kao i većim relativnim udelom HDL 3a čestica u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 38). Iako se izolovana plućna manifestacija smatra manje teškim oblikom sa aspekta inflamacije u poređenju sa kombinovanom plućnom i vanplućnom bolešću (28, 29), u ovom slučaju, usled niže doze primenjenog leka u plućnoj sarkoidozi (Tabela 37), može doći do izostanka efekata ovih lekova na lipide, pa dominiraju manje HDL čestice praćene nižom koncentracijom HDL-H.

Rezultati više studija su pokazali da promene u lipidnom profilu mogu biti posledica kako inflamacije, o čijem uticaju je već bilo reči (56, 57, 110), tako i primenjene kortikosteroidne terapije (60). Salazar i sar. su utvrdili da kod nelečenih pacijenata sa sarkoidozom dolazi do značajnog sniženja koncentracije HDL-H da bi primenom prednizolona (prosečna doza 20 mg i prosečno vreme trajanja terapije 6 meseci) došlo do značajnog povećanja nivoa HDL-H, bez promene u koncentracijama LDL-a, VLDL-a i TG (60). Ipak, utvrđeno je da u mijeloproliferativnim bolestima, veće doze kortikosteroida (> 20 mg) i duže trajanje terapije (> 6 meseci) mogu da uzrokuju povišen VLDL-H, LDL-H, HDL-H i TG (145). Kako je većina naših pacijenata bila na terapiji niskom dozom prednizolona (5-10 mg) sa prosečnom dužinom trajanja terapije od [Me (IQR) = 24 (12-39)] meseci, može se reći da je dislipidemija verovatno posledica same bolesti, ali da i delimično može da se pripíše uticaju terapije.

Rezultati dobijeni u našoj studiji potvrđuju snižen antioksidativni potencijal HDL čestica kroz značajno smanjenu aktivnost PON1 enzima kod pacijenata sa sarkoidozom. POazna aktivnost je bila značajno niža kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu dok je DZOazna aktivnost takođe bila niža, ali razlika nije dostigla statističku značajnost (Tabela 26 i Slika 21). Do sada je samo u radu Uzun-a i saradnika (113) dokumentovana snižena POazna aktivnost u sarkoidozi, ali bez uvida u fenotip enzima ili povezanost ove enzimske aktivnosti sa inflamacijom, lipidima ili oksidativnim stresom.

POazna aktivnost je bila u značajnoj pozitivnoj asocijaciji sa koncentracijama UH, LDL-H i HDL-H (Tabela 29). Kako je PON1 lokalizovan na HDL česticama (86), ovakva korelacija sa HDL-om može i da se očekuje. Nalaz pozitivne korelacije između POaze i LDL-H

bi verovatno mogao da se objasni time da što je više LDL-H, veća je i aktivnost enzima kako bi sprečio oksidativnu modifikaciju LDL čestica. DZOazna aktivnost je bila u značajnoj negativnoj korelaciji sa SAA, PAB i MDA (Tabela 29). Da bi se proverilo da li inflamacija i oksidativni stres mogu biti nezavisno povezani sa sniženjem aktivnosti DZOazne aktivnosti, urađena je i multipla linearna regresiona analiza koja je pokazala da čak 71% varijacije u DZOaznoj aktivnosti može da se objasni varijacijama u koncentracijama SAA, PAB i TOS (Tabela 30). SAA, bilo da se kombinuje samo sa parametrima oksidativnog stresa ili zajedno sa lipidima i oksidativnim stresom, nezavisno je povezan sa smanjenjem DZOaze. Naši rezultati koji su pokazali inverznu korelaciju između DZOazne aktivnosti PON1 i SAA (Tabele 29 i 30) u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim za pacijente sa metaboličkim sindromom (146) i sa reumatoidnim artritismom (147), gde je pokazano da povišen SAA doprinosi sniženju PON1 aktivnosti. Naime, SAA i PON1 se sintetišu u jetri, ali tokom inflamatornih reakcija, povećava se produkcija SAA, a smanjuje PON1 (109). Međutim, u studiji Kappelle i saradnika (146) postavljeno je pitanje da li se recipročna regulacija sinteze SAA i PON1, koja je inače pod uticajem proinflamatornih citokina, zaista dešava u stanjima inflamacije niskog stepena. Bez obzira na to, isti autori (146) naglašavaju da bi SAA svakako mogao da doprinese stvaranju disfunkcionalnih HDL čestica i u uslovima inflamacije niskog stepena. Kako postoje podaci o značaju apoA-I u stabilizaciji PON1 u HDL česticama (108), zatim o smanjenoj sintezi apoA-I (109) kao i o njegovoj izmeni sa SAA tokom inflamacije (36, 109, 148), može da se pretpostavi da i gubitak apoA-I takođe dovodi do sniženja PON1 aktivnosti. Veruje se da PON1 poseduje N-terminalnu hidrofobnu sekvencu kojom se vezuje za fosfolipide HDL čestice (108, 149). ApoA-I može direktno da se veže za PON1 (149) ili ova dva proteina mogu biti povezana fosfolipidima (108). Pored uloge apoA-I, smatra se da i hidrofobna sredina HDL-a može biti ključna za aktivnost PON1 (149). Generalno, struktura HDL čestice se menja tokom inflamacije i dolazi do hemijske promene aktivnog centra enzima i smanjenja aktivnosti (147).

PON1 poseduje sposobnost neutralizacije lipidnih hidroperoksida čime štiti LDL čestice od oksidativne modifikacije (86). Ipak, kao posledica povećanog oksidativnog stresa i inflamacije koje su opisane i kod naših pacijenata, može doći do nishodne regulacije u transkripciji gena za PON1 (140, 147, 150, 151). Pretpostavlja se da oksidovani lipidi reaguju sa SH grupama na enzimu i tako ga inaktiviraju (152). Odsustvo značajnih korelacija između PON1 i parametara inflamacije i oksidativnog stresa kod zdravih ispitanika (Tabela 28) govori u prilog

tome da inflamacija, kao ključni proces koji se dešava u sarkoidozi, može imati značajan uticaj na metabolizam lipoproteinskih čestica kod ovih pacijenata.

Značajno je pomenuti da u stanjima povećanog oksidativnog stresa (što se u slučaju naših ispitanika ogleda kroz značajno povišen PAB, ali i povišen TOS u plućnoj manifestaciji bolesti u odnosu na kontrolnu grupu) može doći i do ushodne regulacije transkripcije gena koji kodiraju sintezu anti-inflamatornih/antioksidativnih proteina (38, 153) čime eventualno može da se objasni značajno veća POazna aktivnost u izolovanoj plućnoj sarkoidozi u poređenju sa kombinovanim plućnom i vanplućnom bolešću (Tabela 39).

Pre nego što se pristupilo analizi fenotipa PON1, izvršena je optimizacija metode kako bi se uvidelo uz koju koncentraciju NaCl u puferu se postiže najbolje razdvajanje fenotipova. Utvrđeno je da sa porastom koncentracije NaCl, dolazi do značajnog povećanja POazne aktivnosti. Za DZOazu najveća aktivnost je postignuta uz 2 mol/L NaCl da bi uz veću koncentraciju soli došlo do značajnog pada aktivnosti (Tabela 21). Primenom različitih koncentracija soli, dobijene su i različite antimodalne vrednosti koje definišu granice između fenotipova (Tabela 22), a optimalno razdvajanje je postignuto uz NaCl koncentracije 2 mol/L (Slike 17 i 18) što je predloženo i u originalnoj metodi (154), pa smo se zato zadržali na ovoj koncentraciji. POazna aktivnost je bila značajno niža kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu kod QQ i QR fenotipa dok je DZOaza bila značajno niža kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu samo kod QQ fenotipa (Tabela 27 i Slika 22). Konstruisanjem grafika na kome je na y-osi DZOazna, a na x-osi POazna aktivnost, moguće je identifikovati fenotip svakog subjekta iz grupe pacijenata, kao i kontrolne grupe (Slike 17 i 18). Sa slika se može uočiti da QQ i RR podgrupe su grupisane oko jedne zajedničke prave linije i kod kontrole i kod pacijenata dok su podaci koji odgovaraju QR grupi rasuti oko linije, ali ipak jasno odvojeni od QQ i RR fenotipa. Analiza fenotipa je rađena u nekim drugim studijama koje su se bavile kardiovaskularnim bolestima koje u patogenezi takođe podrazumevaju prisustvo inflamacije, oksidativnog stresa i dislipidemije. U studiji Kotur Stevuljević i saradnika (155) dobijena je značajno niža aktivnost POaze kod pacijenata sa QR i RR fenotipom u odnosu na zdrave osobe dok je DZOaza bila nešto niža u grupi pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom kod svih fenotipova, ali bez statističke značajnosti.

Razlike u raspodeli fenotipova i alela PON1 između pacijenata sa sarkoidozom i zdravih ispitanikanisu bile statistički značajne (Tabela 23). Do sada nije objavljena nijedna studija koja se bavila ovakvim razlikama u distribuciji fenotipova u sarkoidozi. Neke studije koje su ispitivale raspodelu fenotipova PON1 kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću (155, 156) pokazale su da nema značajne razlike između tih pacijenata i kontrolne grupe, dok su druge studije ukazale na postojanje razlike u raspodeli fenotipova između zdravih osoba i pacijenata sa kardiovaskularnim bolestima (95).

Naši rezultati pokazuju da u izolovanoj plućnoj manifestaciji oboljenja, procenat HDL subfrakcije HDL 3c, kao i malih HDL čestica značajno pozitivno koreliraju sa TOS i MDA, a negativno sa koncentracijom SH grupa i POaznom aktivnošću. Sa druge strane, veće HDL 2b čestice se nalaze u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom SH grupa i POazom, a u negativnoj sa koncentracijama TOS-a i MDA (Tabela 40). Multipla regresiona analiza je pokazala da kada se godine, pol, serumski oksidativno-stresni status i POazna aktivnost PON1 uključe u model kao nezavisne promenljive, koncentracija TOS-a i POazna aktivnost PON1 imaju značajan nezavistan uticaj na promene u distribuciji malih HDL čestica i ta veza nije umanjena ni nakon korekcije za dozu anti-inflamatornog leka. Ovom analizom je utvrđeno da čak 47,8% varijacija u distribuciji procenta malih HDL čestica može da se objasni povećanjem u koncentraciji TOS-a i sniženjem POazne aktivnosti (Tabela 42). Inverzna asocijacija između POaze i zastupljenosti malih HDL čestica mogla bi da bude posledica povećanja aktivnosti enzima kako bi se kompenzovao defekt u sazrevanju HDL čestica. U kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj bolesti, nije pronađen ovakav stepen korelacije između malih HDL čestica i parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite (Tabela 41) i ovo odsustvo korelacija bi moglo da se pripíše većoj dozi leka koja je primenjena u terapiji.

Analiza LDL subfrakcija je pokazala da se manje LDL čestice nalaze u pozitivnoj korelaciji sa MDA i u plućnoj i u kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj bolesti (sekcija 4.7.2). Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa podacima koje su publikovali Kondo i saradnici (157), u kojima se navodi da osobe sa malim LDL česticama i visokom koncentracijom TG imaju i povećane koncentracije MDA-modifikovanih LDL čestica. Prema našim rezultatima, klinička manifestacija oboljenja nije značajno uticala na profil LDL subfrakcija.

Konačno, treba pomenuti i neka ograničenja naše studije. Jedno od njih bi bilo da su svi pacijenti bili na terapiji kortikosteroidima i/ili drugim imunosupresivnim lekovima, zbog čega se naši rezultati ne mogu ekstrapolirati na pacijente koji nisu primali terapiju. Zato, neki rezultati mogu da se pripišu kako samoj bolesti tako i efektima lekova. Zatim, naša studija je opservacionog tipa i uključuje analizu podataka dobijenih iz grupe pacijenata u jednoj određenoj vremenskoj tački (tzv. “cross-sectional” studija), pa bi bilo potrebno da se parametri dalje analiziraju u prospektivnim studijama.

Ukupno uzevši, rezultati prikazani u disertaciji pokazuju da se pacijenti sa sarkoidozom nalaze u stanju povećane inflamacije i oksidativnog stresa, dislipidemije i promenjene distribucije LDL i HDL subfrakcija. Iz toga proizilazi da pacijenti sa sarkoidozom mogu imati povišen rizik za KVB. Prethodne studije koje su ispitivale pacijente sa hroničnim inflamatornim bolestima utvrdile su da kod njih postoji povećan rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (63, 158). Na osnovu vrednosti hsCRP-a dobijenih kod pacijenata, može se reći da se oni nalaze u kategoriji umerenog rizika za KVB (1-3 mg/L). Utvrđeno je i da prisustvo malih LDL i HDL čestica i povišen oksidativni stres mogu biti uključeni u nastanak i razvoj aterosklerotskog plaka (159, 160), a opisane su i promene u krvnim sudovima kod pacijenata sa fibroznim plućnim bolestima (63). Iako naši pacijenti nemaju fibrozni stadijum bolesti, zbog povezanosti oksidativno-stresnih parametara i tradicionalnih faktora rizika za aterosklerozu, kao i povećane vrednosti aterogenog indeksa (TG/HDL-H), može se zaključiti da faktori koji doprinose nastanku i razvoju ateroskleroze mogu da ispolje svoj uticaj i mnogo pre pojave fibroze. Naši rezultati doprinose rasvetljavanju kompleksne povezanosti između sarkoidoze i ateroskleroze i ukazuju na potrebu da se ova veza istraži dalje u većim, prospektivnim studijama kako bi se bi se potvrdilo postojanje faktora rizika i odredila prevalenca KVB u ovoj populaciji pacijenata.

6. ZAKLJUČCI

1. Pacijenti sa sarkoidozom se nalaze u stanju inflamacije, koje se karakteriše povećanim vrednostima SAA i hsCRP-a u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je razlika za SAA izraženija nego razlika dobijena za hsCRP, što ukazuje na specifičan značaj ovog parametra u sarkoidozi.
2. Ispitivani parametri inflamacije se ne razlikuju značajno između pacijenata sa različitim tokom/manifestacijama bolesti, što bi moglo da bude posledica efekata kortikosteroida na inflamatorni proces.
3. Pacijenti sa sarkoidozom imaju povećan nivo markera oksidativnog stresa i snižene vrednosti markera antioksidativne zaštite određenih u serumu i eritrocitima. Utvrđeno je prisustvo značajnih korelacija između parametara oksidativnog stresa i parametara inflamacije kod pacijenata, ali ne i kod zdravih ispitanika, kod kojih i ne postoji inflamacija. Ovo potvrđuje da inflamatorni procesi prisutni u bolesti mogu da dovedu do povećanog oksidativnog stresa.
4. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u serumu i eritrocitima u akutnom i hroničnom toku bolesti su se razlikovali značajno samo u odnosu na kontrolnu grupu, dok značajne razlike između pacijenata sa akutnom i hroničnom bolešću nisu zabeležene. Kada su analizirani rezultati dobijeni kod pacijenata sa plućnom sarkoidozom, kombinovanom plućnom i vanplućnom bolešću i kontrolne grupe, PAB je bio jedini parametar sa značajno višom koncentracijom u plućnoj sarkoidozi u odnosu na kontrolnu grupu.
5. Serumski i eritrocitni MDA su se pokazali kao najbolji prediktori prisustva oboljenja među drugim parametrima oksidativno-stresnog statusa. Oba parametra su zadržala svoju prediktivnu sposobnost i nakon podešavanja za druge parametre oksidativno-stresnog statusa, kao i za lipidne parametre.
6. U ROC analizi dijagnostičke tačnosti parametara, koncentracija S-MDA je imala izvanredan potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od kontrolne grupe dok se nivo S-TOS-a odlikovao odličnom dijagnostičkom tačnošću. Modeli sačinjeni od kombinacije više oksidanasa i/ili antioksidanasa su imali bolji potencijal razdvajanja pacijenata sa sarkoidozom od zdravih ispitanika u odnosu na pojedinačne parametre.

7. Pacijenti sa sarkoidozom se karakterišu dislipidemijom, koja se ogleda uznačajno povećanim vrednostima UH, TG i sniženim vrednostima HDL-H, kao i predominacijom manjih HDL i LDL čestica. U grupi pacijenata, utvrđene su značajne pozitivne korelacije između TG i LDL-H i oksidanasa, kao i između HDL-H i antioksidanasa. Takve korelacije nisu nađene kod zdravih ispitanika, što upućuje na uticaj povećanog oksidativnog stresa na lipidne parametre.

8. U hroničnoj sarkoidozi, kao i kod pacijenata sa izolovanom plućnom manifestacijom bolesti, dominiraju HDL čestice manje veličine. Opisane asocijacije bi mogle biti posledica kako same bolesti, tako i primenjene terapije.

9. POazna aktivnost PON1 je bila značajno niža u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu dok sniženje DZOazne aktivnosti kod pacijenata nije dostiglo nivo statističke značajnosti. SAA se pokazao kao nezavisni prediktor DZOazne aktivnosti. U izolovanoj plućnoj manifestaciji oboljenja, POazna aktivnost je značajno viša nego u kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj bolesti.

10. Razdvajanjem ispitivanih subjekata prema fenotipu za položaj 192 dobija se značajno niža aktivnost POaze i DZOaze u grupi pacijenata u poređenju sa kontrolom za fenotip QQ, kao i značajno niža POazna aktivnost kod pacijenata za fenotip QR. Nije bilo statistički značajne razlike između raspodela fenotipova i alela PON1 kod pacijenata i zdravih ispitanika.

11. U izolovanoj plućnoj manifestaciji oboljenja utvrđena je značajna povezanost zastupljenosti malih HDL česticasa parametrima oksidativno-stresnog statusa i POazne aktivnosti PON1. Ovakve korelacije nisu uočene u kombinovanoj plućnoj i vanplućnoj manifestaciji bolesti. Klinička manifestacija oboljenja nije značajno uticala na profil LDL subfrakcija.

7. LITERATURA

1. Baughman RP, Tierstein AS, Judson MA, Rossman MD, Yeager H, Bresnitz E, DePalo L, Hunnighake G, Iannuzzi MC, Johns CJ, McLennan G, Moller DR, Newman LS, Rabin DL, Rose C, Rybicki B, Weinberger SE, Terrin ML, Knatterud GL, Cherniak R. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1885-9.
2. The joint statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG). Statement on Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 736–55.
3. Stop sarcoidosis [homepage on the Internet]. Chicago: Foundation for Sarcoidosis Research; c2010. General info; [about 2 screens]. Available from <http://www.stopsarcoidosis.org/sarcoidosis/diseasefacts.htm>
4. Stojšić J, Vučinić-Mihailović V, Jovanović D, Stojković M, Videnović-Ivanov J, Filipović S. Evaluation of the role of pathology in the diagnosis and differential diagnosis of pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis. *Srp Arh Celok Lek* 2011; 139: 481-485.
5. Martinetti M, Tinelli C, Kolek V, Cuccia M, Salvaneschi L, Pasturenzi L, Semenzato G, Cipriani A, Bartova A, Luisetti M. “The sarcoidosis map”: a joint survey of clinical and immunogenetic findings in two European countries. *Am J Resp Crit Care Med* 1995; 152: 557-564.
6. Milman N, Andersen AB. Detection of antibodies in serum against *M. tuberculosis* using Western blot technique: comparison between sarcoidosis patients and healthy subjects. *Sarcoidosis* 1993; 10: 29-31.
7. Chapman JS, Speight M. Further studies of mycobacterial antibodies in the sera of sarcoidosis patients. *Acta Med Scand Suppl* 1964; 425: 61-67.

8. Hanngren A, Odham G, Eklund A, Hoffner S, Stjernberg N, Westerdahl G. Tuberculostearic acid in lymph nodes from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1987; 4: 101-104.
9. Eishi Y, Ando N, Takemura T, Matui Y. Pathogenesis of granuloma formation in lymph nodes with sarcoidosis. *Sarcoidosis* 1992; 9:669.
10. Saboor SA, Johnson NM, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet* 1992; 1012-1015.
11. Mitchell IC, Turk JL, Mitchell DN. Detection of mycobacterial rRNA in sarcoidosis with liquid-phase hybridization. *Lancet* 1992; 339: 1015-1017.
12. Song Z, Marzilli L, Greenlee BM, Chen ES, Silver RF, Askin FB, Teirstein AS, Zhang Y, Cotter RJ, Moller DR. Mycobacterial catalase–peroxidase is a tissueantigen and target of the adaptive immune response in systemic sarcoidosis. *J Exper Med* 2005; 201: 755–767.
13. Chen ES, Song Z, Willett MH, Heine S, Yung RC, Liu MC, Groshong SD, Zhang J, Tuder RM, Moller DR. Serum amyloid A regulates granulomatous inflammation in sarcoidosis through Toll-like receptor-2. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 360–73.
14. Hunninhake GW, Crystal RG. Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity. *N Engl J Med* 1981; 305: 429-434.
15. Semenzato G, Pezzutto A, Chilosi M, Pizzolo G. Redistribution of T lymphocytes in the lymph nodes of patients with sarcoidosis. *N Engl J Med* 1982; 306: 48-49.
16. Pinkston P, Bitterman PB, Crystal RG. Spontaneous release of interleukin-2 by lung T-lymphocytes in active pulmonary sarcoidosis. *N Engl J Med* 1983; 308: 793-800.
17. Hunninghake GW, Bedell GN, Zavala DC, Monick M, Brady M. Role of interleukin-2 release by lung T-cells in active pulmonary sarcoidosis. *Am Rev Resp Dis* 1983; 128: 634-638.

18. Longscope W, Frieman D. A study of sarcoidosis based on combined investigation of 160 cases including 30 autopsies from the Johns Hopkins Hospital and Massachusetts General Hospital. *Medicine* 1952; 31: 1-142.
19. Iwai K, Tachibana T, Takemura T, Matsui Y, Kitaichi M, Kawabata Y. Pathological studies on sarcoidosis autopsy: I. Epidemiological studies of 320 cases in Japan. *Acta Pathol Jpn* 1993; 43: 372-376.
20. Rosen Y. Sarcoidosis. In DH Dail and SP Hammer editors. *Pulmonary pathology*, 2nd ed. Springer-Verlag, NY1994; 45-67.
21. Colby TV. Interstitial lung diseases. In W. Thurlbeck and A. Churg editors. *Pathology of the Lung*, 2nd ed. Thieme Medical Publishers, NY 1995; 589-737.
22. <https://en.wikipedia.org/wiki/Granuloma>
23. <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/pulmonary/sarcoidosis/>
24. Williams GT, Williams WJ. Granulomatous inflammation – a review. *J Clin Pathol* 1983; 36: 723-733.
25. Ahmadzai H, Loke WSJ, Huang S, Herbert C, Wakefield D, Thomas PS. Biomarkers in sarcoidosis: a review. *Curr Biomarker Find* 2014; 4: 93–106.
26. Vučinić Mihailović V, Videnović Ivanov J, Filipović S, Marić Živković J. Sarkoidoza: dijagnostičko-terapijski algoritmi. Jugoslovensko udruženje za sarkoidozu (projekat Ministarstva nauke Republike Srbije), Beograd 2007.
27. Lofgren S. Erythema nodosum: studies on etiology and pathogenesis in 185 adult cases. *Acta Med Scand* 1946; 124: 1-197.

28. Drent M, Wirnsberger RM, deVries J, Van Dieijen-Visser M, Wouters EFM, Schols AMWJ. Association of fatigue with an acute phase response in sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999;13:718-22.
29. Gvozdrenović B, Mihailović-Vučinić V, Ilić-Dudvarski A, Žugic V, Judson MA. Differences in symptom severity and health status impairment between patients with pulmonary and pulmonary plus extrapulmonary sarcoidosis. *Resp Med* 2008; 102: 1636-42.
30. Muller-Quernheim J. Serum markers for the staging of disease activity of sarcoidosis and other interstitial lung diseases of unknown etiology. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1998;15: 22–37.
31. Baughman RP, Culver DA, Judson MA. A Concise Review of Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 573–581.
32. Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. *Clin Chem* 2001; 47: 403-411.
33. Rothkrantz-Kos S, Van Dieijen-Visser MP, Mulder PGH, Drent M. Potential usefulness of inflammatory markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. *Clin Chem* 2003; 49:1510–7.
34. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999; 265: 501-523.
35. Chen ES, Song Z, Yarmus LB, Feller-Kopman DJ, Lee H, Arias S, Moller DR. Systemic Upregulation Of Proinflammatory Responses To Serum Amyloid A And Other TLR2 Agonists Suggest TLR2 Pathway Is Critical To The Pathobiology Of Sarcoidosis: A GRADS Site-Specific Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191:A5815.
36. Bargagli E, Magi B, Olivieri C, Bianchi N, Landi C, Rottoli P. Analysis of serum amyloid A in sarcoidosis patients. *Resp Med* 2011; 105: 775-80.

37. <http://www.cloud-clone.com/items/A885.html>
38. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 222-239.
39. Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 1984; 105: 429-435.
40. Koutsokera A, Papaioannou AI, Malli F, Kiropoulos TS, Katsabeki A, Kerenidi T, Gourgoulisanis KI, Daniil ZD. Systemic oxidative stress in patients with pulmonary sarcoidosis. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22: 603–7.
41. Kotur Stevuljević J, Memon L, Stefanović A, Spasić S, Spasojević Kalimanovska V, Bogavac Stanojević N, Kalimanovska Oštrić D, Jelić Ivanović Z, Žunić G. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2007; 40: 181-187.
42. Girotti MJ, Khan N, Mc Lellea BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 32-5.
43. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38: 1103-1111.
44. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-22.
45. Lenz AG, Hinze-Heyn H, Schneider A, Behr J, Außinger KH, Heindl S, Stanzel F, Maier KL. Influence of inflammatory mechanisms on the redox balance in interstitial lung disease. *Resp Med* 2004; 98: 737-45.

46. Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, Prasse A, Muller-Quernheim J, Rottoli P. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review. *Resp Med* 2009; 103: 1245-1256.
47. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277-285.
48. Hamidi Alamdari D, Ghayour-Mobarhan M, Tavallaie S, Reza Parizadeh M; Moohebat M, Ghafoori F, Kazemi-Bayestani SMR, Paletas K, Pegiou T, Koliakos G. Prooxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008; 41: 375-380.
49. Hamidi Alamdari D, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2007; 40: 248-254.
50. Boots AW, Drent M, Swennen ELR, Moonen HJJ, Bast A, Haenen GRMM. Antioxidant status associated with inflammation in sarcoidosis: A potential role for antioxidants. *Resp Med* 2009; 103: 364-72.
51. Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, Panagou P, Loukides S, Siafakas NM, Bouros D. 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2004; 125: 1005-1011.
52. Lakari E, Pääkkö P, Kinnula VL. Manganese superoxide dismutase, but not CuZn superoxide dismutase, is highly expressed in the granulomas of pulmonary sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 589-596.
53. Winterbourn CC, Stern A. Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J Clin Invest* 1987; 80: 1486-1491.

54. Nadeem A, Masood A, Siddiqui N. Oxidant-antioxidant imbalance in asthma: scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options. *Ther Adv Respir Dis* 2008; 2: 215-235.
55. Rothkrantz-Kos S, Drent M, Vuil H, De Boer M, Bast A, Wouters EF, Roos D, Van Diejen-Visser MP. Decreased redox state in red blood cells from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Dif* 2002; 19: 114-20.
56. Byrne CD. Triglyceride-rich lipoproteins: are links with atherosclerosis mediated by a procoagulant and proinflammatory phenotype? *Atherosclerosis* 1999; 145:1-15.
57. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Anthony F, Suffredini AF, Heinecke JW. Inflammatory Remodeling of the HDL Proteome Impairs Cholesterol Efflux Capacity. *J Lip Res* 2015; doi: 10.1194/jlr.M059089.
58. Kindman LA, Gilbert HS, Almenoff JS, Ginsberg H, Fagerstrom R, Teirstein AS. High-density lipoprotein cholesterol is reduced in patients with sarcoidosis. *Am J Med* 1989; 86: 376-378.
59. Salazar A, Mana J, Pinto X, Argimon JM, Castineiras MJ, Fiol C, Pujol R. Low levels of high-density lipoprotein cholesterol in patients with active sarcoidosis. *Atherosclerosis* 1998; 136:133-7.
60. Salazar A, Mana J, Pinto X, Argimon JM, Hurtado I, Pujol R. Corticosteroid therapy increases HDL-cholesterol concentrations in patients with active sarcoidosis and hypoalphalipoproteinemia. *Clin Chim Acta* 2002; 320: 59-64.
61. Strohmayer EA, Krakoff LR. Glucocorticoids and cardiovascular risk factors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011; 40: 409-417.

62. Tietge U. Hyperlipidemia and cardiovascular disease – inflammation, dyslipidemia and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25: 94-5.
63. Kizer JR, Zisman DA, Blumenthal NP, Kotloff RM, Kimmel SE, Strieter RM, Arcasoy SM, Ferrari VA, Hansen-Flaschen J. Association between pulmonary fibrosis and coronary artery disease. *Arch Intern Med* 2004; 164: 551-556.
64. Ardic I, Yarlioglu M, Dogdu O, Buyukoglan H, Kanbay A, Akpek M, Bol C, Yuksel M, Akkaya E, Vuruskan E, Gungor KM. Assessment of aortic elastic properties in patients with sarcoidosis. *Blood Pressure* 2012; 21: 286–292.
65. Rizzo M, Berneis K, Zeljkovic A, Vekic J. Should we routinely measure low-density and high-density lipoprotein subclasses? *Clin Lab* 2009; 55: 421-429.
66. Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low-density lipoproteins (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 189-210.
67. Kraus RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low-density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23: 97-104.
68. Packard CJ, Gaw A, Demant T, Shepherd J. Development and application of a multicompartamental model to study very low density lipoprotein subfraction metabolism. *J Lipid Res* 1995; 36: 172-187.
69. Zambon A, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation* 1999; 99: 1959-1964.

70. Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Proatherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL (1) and dense LDL in type 2 diabetes: impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 282-288.
71. Packard CJ, Demant T, Stewart JP, Bedford D, Caslake MJ, Schwertfeger G, Bedynek A, Shepherd J, Seidel D. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res* 2000; 41: 305-318.
72. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *J Am Med Assoc* 1996; 276:875–881.
73. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:93–102.
74. Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein: insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:103–112.
75. Feretti G, Bacchetti T, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis* 2006; 184:1-7.
76. Kontush A, Chapman J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 342–374.
77. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; 15: 2073-2084.
78. Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson AD, Van Lenten BJ, Vora D, Fogelman AM. HDL and the inflammatory

response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Dis* 2001; 21: 481-488.

79. Blanche PJ, Gon EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665: 408-419.

80. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 261-311.

81. Calabresi L, Franceschini G, Jonas A. Lecithin:cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins and atheroprotection in humans. *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20: 50-53.

.

82. Van Tol A. Phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13: 135-139.

83. Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther* 2004; 101: 17-38.

84. Andreassen OA, Desikan RS, Wang Y, Thompson WK, Schork AJ, Zuber V, Doncheva NT, Ellinghaus E, Albrecht M, Mattingsdal M, Franke A, Lie BA, Mills I, Aukrust P, McEvoy LK, Đurović S, Karlsen TH, Dale AM. Abundant Genetic Overlap between Blood Lipids and Immune-Mediated Diseases Indicates Shared Molecular Genetic Mechanisms. *Plos One*; 2015: DOI:10.1371/journal.pone.0123057.

85. Zeljković A, Vekić J, Spasojević-Kalimanovska V, Jelić Ivanović Z, Bogavac Stanojević N, Gulan B, Spasić S. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis* 2010; 210:548–54.

86. Goswani B, Tayal D, Gupta N, Malika V. Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clin Chim Acta* 2009; 410: 1-12.

87. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-154.
88. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 379-388.
89. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. Lipids, lipoproteins and cardiovascular risk factors: Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin Chem* 2004; 50: 2309-2315.
90. <http://www.discoverymedicine.com/Amir-Aharoni/2009/06/18/directed-evolution-of-recombinant-serum-paraoxonase-pon-variants/>
91. Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2006; 47: 2492-2502.
92. Brophy VH, Jarvik GP, Furlong CE. PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE 2002. *Paraoxonase in health and disease: Basic and clinical aspects*. Norwell, MA: Kluwer Acad. 53-57.
93. Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003; 54: 371-392.
94. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991; 30: 10141-10149.
95. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3: 73-76.

96. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998; 139: 341-349.
97. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96: 3005-3008.
98. Davis HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield C, Sowalla J, Furlong CE. The effect of human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996; 14:334-336.
99. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1₁₉₂ or PON1₅₅ genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2441-2447.
100. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, Margolin S, Rieder M, Nickerson D, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Furlong CE. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1465-1471.
101. Daniil G, Phedonos AAP, Holleboom AG, Motazacker MM, Argyri L, Kuivenhoven JA, Chroni A. Characterization of antioxidant/anti-inflammatory properties and apo-AI-containing subpopulations of HDL from family subjects with monogenic low HDL disorders. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1213-1220.
102. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM., Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95: 764-772.

103. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.
104. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1617-1624.
105. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Savino S, Liuzzi A, Balzola F, Bicchiega V. Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005; 90: 1728-1733.
106. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 461-467.
107. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase 1 secretion, stability and activity. *Free Rad Biol Med* 2004; 37: 1986-1994.
108. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2214-2225.
109. Han C.Y, Chiba T, Campbell J.S, Fausto N, Chaisson M, Orasanu G, Plutzky J, Chait A. Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1806-13.

110. Salazar A, Pintó X, Mañá J. Serum amyloid A and high-density lipoprotein cholesterol: serum markers of inflammation in sarcoidosis and other systemic disorders. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 1070-7.
111. Rocken C, Kisilevsky R. Comparison of the binding and endocytosis of high-density lipoprotein from healthy (HDL) and inflamed (HDL-(SAA)) donors by murine macrophages of four different mouse strains. *Virchows Arch* 1998;432:547-55.
112. Steinmetz A, Hocke G, Sattler R, Puchois P, Fruchart JC. Influence of serum amyloid A on cholesterol esterification in human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1989;1006:173-8.
113. Uzun H, Yanardag H, Gelisgen R, Genc H, Uygun S, Vehid S, Karter Y, Demirci S. Levels of paraoxonase, an index of antioxidant defense in patients with active sarcoidosis. *Curr Med Resp Opin* 2008; 24: 1651-7.
114. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
115. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse: Lipidski poremećaji. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd 2012.
116. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenworld RA, editor. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1985: 123-132.
117. Ellman Gl. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1952; 82: 70-77.
118. Misra HP, Fridovich I. Chemistry and metabolism of substances of low molecular weight: the role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.

119. Richter RJ, Jampsa RL, Jarvik GP, Costa LG, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status and genotypes at specific polymorphisms sites. In: Maines M, Costa LG, Reed DJ, Hodgson E, editors. *Curr Prot Toxicol*, NY, John Wiley and Sons 2004.
120. Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase; glutamine or arginine at position 192 for respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 598-608.
121. Rainwater DL, Moore PH, Gamboa IO. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res* 2004; 45: 773-775.
122. Vekić J, Topić A, Zeljković A, Jelić Ivanović Z, Spasojević Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clin Biochem* 2007; 40: 310-316.
123. Hosmer DW, Lemeshow S. Assessing the fit of the model. *Applied logistic regression*. NY John Wiley and Sons; 2000: 160-164.
124. Miyoshi S, Hamada H, Kadowaki T, Hamaguchi N, Ito R, Irifune K, Higaki J. Comparative evaluation of serum markers in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2010; 137: 1391-1397.
125. Barnes PJ. Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol* 2011; 163: 29-43.
126. Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:381-8.
127. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 245-254.

128. Lynch RE, Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J Biol Chem* 1978; 253: 4697-4699.
129. Delibas N, Ozankaya R, Altuntas I. Clinical importance of erythrocyte malondialdehyde levels as a marker of cognitive deterioration in patients with dementia of Alzheimer type: a repeated study in 5-year interval. *Clin Biochem* 2002; 32: 137-141.
130. Kelly FJ. Vitamins and respiratory disease: antioxidant micronutrients in pulmonary health and disease. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 510-526.
131. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: S38-43.
132. Telci A, Cakatay U, Kayali R, Erdogan C, Orhan Y, Sivas A, Akcay T. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 2000;32:40–3.
133. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977; 78: 67-82.
134. Haddad JJ. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsivetranscription factors in development and pathophysiology. *Respir Res* 2002;3:26.
135. Albano E, Mottaran E, Occhino G, Reale E, Vidali M. Review article: role of oxidative stress in the progression of non-alcoholic steatosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22 (Suppl 2): 71-73.
136. Albano E, Mottaran E, Vidali M, Reale E, Saksena S, Occhino G, Burt AD, Day CP. Immune response towards lipid peroxidation products as a predictor of progression of non-alcoholic fatty liver disease to advanced fibrosis. *Gut* 2005; 54: 987-993.

137. Albano E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 278–90.
138. Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. *J Clin Invest* 1995;96:2461–8.
139. Salazar A, Mana J, Concepcion F, Hurtado I, Argimon JM, Pujol R, Pinto X. Influence of serum amyloid A on the decrease of high-density lipoprotein cholesterol in active sarcoidosis. *Atherosclerosis* 2000; 152: 497-502.
140. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol Med* 1999; 26: 892-904.
141. Vekić J, Kotur Stevuljević J, Jelić Ivanović Z, Spasić S, Spasojević Kalimanovska V, Topić A, Zeljković A, Stefanović A, Žunić G. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 715-723.
142. Li H, Horke S, Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014; 237: 208-19.
143. Olusi SO, George S. Prevalence of LDL atherogenic phenotype in patients with systemic lupus erythematosus. *Vasc Health Risk Manag* 2011; 7: 75-80.
144. Rizzo M, Spinass GA, Cesur M, Ozbalkan Z, Rini GB, Berneis K. Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in drug-naive patients with early rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2009; 207: 502-506.
145. Ginsberg HN, Le NA, Gilbert HS. Altered high-density lipoprotein metabolism in patients with myeloproliferative disorders and hypocholesterolemia. *Metabolism* 1986; 35: 878-882.

146. Kappelle PJVH, Bijzet J, Hazenberg BP, Dullaart RPF. Lower serum paraoxonase-1 activity is related to higher serum amyloid A levels in metabolic syndrome. *Arch Med Res* 2011; 42: 219-225.
147. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, Okhubo S, Ikeda Y, Nishiya K, Hashimoto K. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2003; 72: 2877-2885.
148. Li H, QOoi S, Heng CK. The role of NF- κ B in SAA-induced peroxisome proliferators activated receptor c activation. *Atherosclerosis* 2013; 227: 72-78.
149. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration and phenotype in diabetes mellitus and its relationship with lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1812-1818.
150. Gergely T, Molnar V, Semsei AF, Kizsel P, Ungvari I, Pocza P, Wiener Z, Komlosi ZI, Kunos L, Galffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of paraoxonase-1 in the disease. *Intern Immun* 2009;21:967-75.
151. Selek A, Cosar N, Kocyigit A, Erel O, Aksoy N, Gencer M, Gunak F, Aslan M. PON1 activity and total oxidant status in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clin Biochem* 2008;41:140-4.
152. Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, Moulin P. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q – R genetic polymorphism. *J Lipid Res* 1999; 40: 133-139.
153. Rahman I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutat Res-Fund Mol M* 2005;579:58–80.

154. Richter R, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 745-753.
155. Kotur Stevuljević J, Spasić S, Stefanović A, Zeljković A, Bogavac Stanojević N, Kalimanovska Oštrić D, Spasojević Kalimanovska V, Jelić Ivanović Z. Paraoxonase 1 (PON1) activity, but not PON1_{Q192R} phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-aged Serbian population. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1106-1113.
156. Antikainen M, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, Frick MH, Ehnholm C. The Gln-Arg 192 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996; 98: 833-835.
157. Kondo A, Muranaka Y, Ohta I, Notsu K, Manabe M, Kotani K, Saito K, Maekawa M, Kanno T. Relationship between triglycerides concentrations and LDL size evaluated by malondialdehyde-modified LDL. *Clin Chem* 2001;47:893-900.
158. Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *Can J Cardiol* 2011;27:174–82.
159. Kotur Stevuljevic J, Spasic S, Jelic Ivanovic Z, Spasojevic Kalimanovska V, Stefanovic A, Vujovic A, Memon L, Kalimanovska Oštrić D. PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clin Biochem* 2008;41:1067-73.
160. Rizzo M, Berneis K, Zeljkovic A, Vekic J. Should we routinely measure low-density and high-density lipoprotein subclasses? *Clin Lab* 2009;55:421-9.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Jasmina Ivanišević je rođena 10.06.1983. u Beogradu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut, upisala je 2002. godine, a diplomirala 04.03.2008. sa prosečnom ocenom 9,65. Školske 2008/2009. upisana je na doktorske akademske studije iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu. Staž za diplomirane farmaceute obavila je u Apoteci „Beograd“, a stručni ispit položila 29.12.2009. godine.

Dobitnik je stipendija Ministarstva prosvete Republike Srbije, Eurobank EFG-a kao jedan od najboljih studenata Univerziteta u Srbiji i stipendija Zadužbine Univerziteta u Beogradu. U toku 2009. do zaposlenja na Farmaceutskom fakultetu, bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj za mlade istraživače-doktorante.

Od 01.09.2009. zaposlena je kao saradnik u nastavi, a od 07.03.2011. kao asistent na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta.

Jasmina Ivanišević učestvuje u izvođenju praktične nastave na različitim predmetima na studijskim programima Magistar farmacije i Magistar farmacije-medicinski biohemičar. Član je komisija za odbranu diplomskih radova i komentor studentskih naučno-istraživačkih radova.

Saradnik je na projektu „*Interaktivna uloga dislipidemije, oksidativnog stresa i inflamacije u aterosklerozi i drugim bolestima: genetički i biohemijski markeri*“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Bila je saradnik na međunarodnom projektu *COST: Biomedicine and Molecular Biosciences; Action: HDL: From Biological Understanding to Clinical Exploitation*, kao i na međunarodnom projektu bilateralne saradnje sa Republikom Slovenijom „*Dijagnostička vrednost novih biomarkera u ranom otkrivanju ateroskleroze kod pacijenata sa terminalnim stadijumom renalne bolesti*“.

Objavila je 16 naučnih radova u međunarodnim časopisima sa SCI liste (9 je objavljeno u časopisima kategorije M21, 1 u časopisu kategorije M22, 5 radova u časopisima M23 i 1 rad u časopisu kategorije M33) i 23 naučna saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јасмина Иванишевић _____

број уписа _____ 10/08 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

_____ Испитивање показатеља инфламације, оксидативног стреса и липидног статуса _____
_____ код пацијената са саркоидозом _____

- 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, 29.8.2016.

Иванишевић Јасмина

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора Јасмина Иванишевић

Број уписа 10/08

Студијски програм Докторске академске студије; модул: медицинска биохемија

Наслов рада Испитивање показатеља инфламације, оксидативног стреса и
липидног статуса код пацијената са саркоидозом

Ментор проф. др Зорана Јелић Ивановић, проф. др Јелена Котур Стевуљевић

Потписани Јасмина Иванишевић

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, 29.8.2016.год.

Иванишевић Јасмина

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање показатеља инфламације, оксидативног стреса и липидног статуса
код пацијената са саркоидозом

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.

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, 29.8.2016.год.

Иванчић Јасмина