



**UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET**



Nena N. Milačić

**Uticaj genskih polimorfizama enzima uključenih u
metabolizam ksenobiotika na patogenezu i klinički tok
hronične opstruktivne bolesti pluća**

Doktorska disertacija

Niš, 2019



University of Niš
Faculty of Medicine



Nena N. Milačić

The influence of xenobiotic metabolizing enzymes' genetic polymorphisms on pathogenesis and clinical evolution of chronic obstructive pulmonary disease

Doctoral dissertation

Niš, 2019

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR

Dr Maja Milojković

Vanredni profesor, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Nišu

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Vladmila Bojanić

Redovni profesor, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Nišu

Dr Ivana Stanković

Redovni profesor, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Nišu

Dr Tatjana Jevtović Stoimenov

Redovni profesor, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Nišu

Dr Olgica Mihaljević

Docent, Fakultet Medicinskih nauka u Kragujevcu, Univerzitet u Kragujevcu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Mentor:

Profesor dr Maja Milojković
Medicinski Fakultet, Univerzitet u Nišu

Naslov:

Uticaj genskih polimorfizama enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika na patogenezu i klinički tok hronične opstruktivne bolesti pluća

Rezime:

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je sporoprogresivna bolest koju karakteriše ograničenje protoka vazduha kroz disajne puteve koje nije u potpunosti reverzibilno, a koje je udruženo sa poremećenim inflamatornim odgovorom na udahnute čestice i gasove. Pored pušenja cigareta i aerozagađenja, geni uključeni u procese inflamacije i oksidativnog stresa mogu biti značajni u patogenezi hronične opstruktivne bolesti pluća.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita zastupljenost genskih polimorfizama enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika – MDR1 i CYP3A5 i proinflamatornog citokina TNF- alfa kod obolelelih od HOBP, kao i njihova povezanost sa patogenezom bolesti i kliničkim parametrima obolelih od HOBP.

U studiju je bilo uključeno 92 bolesnika sa HOBP i kontrolna grupa koju je činilo 158 zdravih ispitanika. Detektovanje polimorfizama TNF- α gena –rs1800629 (G-308A) vršeno je metodom PCR-FRLP. Ispitivanje polimorfizama MDR1 gena – rs1045642 (C3435T) i CYP3A5-rs776746 (A6986G) i CYP3A5- rs776746 (A6986G) je vršeno alel- specifičnom PCR metodom.

Dobijeni rezultati pokazuju da je učestalost heterozigotnog oblika MDR1 C3435T značajna veća kod bolesnika sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ($p < 0,004$). T alel MDR1 3435 bio je češći kod pušača u odnosu na nepušače ($p = 0,035$). Unutar kliničke grupe broj leukocita i sedimentacija su bili u statistički značajnoj korelaciji sa prisustvom izmenjenog T-alela genskog polimorfizma

Distribucija genotipa GG, GA i AA-308 TNF- α nije se statistički razlikovala u grupi bolesnika sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika ($p=0,268$). Broj neutrofila bio je statistički značajno veći kod bolesnika sa HOBP GG-308 TNF- α u odnosu na nosioce A-alela ovog genskog polimorfizma (GA i AA-308 TNF- α) ($p=0,067$). Vrednost pH je bila značajno veća kod bolesnika nosilaca GG-308 TNF- α genotipa u odnosu na nosioce A-alela ovog genskog polimorfizma (GA i AA-308 TNF- α) ($p=0,016$). Genotip GG-308 TNF- α je najčešći kod HOBP pacijenata koji su $BMI \leq 18,5$ i u grupi bolesnika sa BMI 18-24,9.

Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su varijantne forme gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam ksenobiotika - MDR1 C3435T i CYP3A5*3, signifikantno češće prisutne kod bolesnika sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanika. Osim toga broj leukocita i sedimentacija su u korelaciji sa izmenjenim genskim statusom MDR1 C3435T, a komorbiditeti su značajno češći kod bolesnika sa nefunkcionalno formom CYP3A5*3. Genski status GA-308 TNF- α bio je statistički u značajnoj vezi sa brojem neutrofila, koji je veći kod nosioca A-alela, dok prisustvo T-alela- 308 TNF- α nije bilo češće kod bolesnika sa HOBP u odnosu na zdrave ispitanike.

**Naučna
oblast:**

Medicina

**Naučna
disciplina:**

Patološka fiziologija, pulmologija

**Ključne
reči:**

HOBP, polimorfizmi jednog nukleotida, MDR1, TNF- α , CYP3A5

UDK:

572.22:615:2]:616.24-008.4-092

CERIF

Klasifikacija

B540 respiratorni sistem

Tip licence

**Kreativne
zajednice:**

CC BY-NC-ND

**Doctoral
supervisor:**

Professor dr Maja Milojković
University of Niš, Faculty of Medicine

Title:

The influence of gene polymorphisms of enzymes involved in the xenobiotics metabolism on pathogenesis and the clinical course of chronic obstructive pulmonary disease

Summary

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a slow-progressive disease characterized by limited airflow through the airways that is not completely reversible, which is associated with a impaired inflammatory response to inhaled particles and gases. In addition to smoking cigarettes and aero pollution, genes involved in inflammation and oxidative stress could play a significant role in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.

The aim of this doctoral dissertation was to examine the frequency of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of genes encoding xenobiotic metabolizing enzymes - cytochrome CYP3A5*1*3 and MDR1 C3435T, and a proinflammatory cytokine, Tumor Necrosis Factor - alpha (TNF- α) -rs1800629, in patients with COPD. The aim was also to establish the possible role of these polymorphisms in the pathogenesis of COPD and their relation to the clinical parameters of patients with COPD.

The study included 92 patients with COPD and a control group with 158 healthy subjects. The determination of the polymorphisms of the TNF- α gene-RS1800629 (G-308A) was performed using the PCR-FRLP method. Polymorphism testing of MDR1 gene-RS1045642 (C3435T) and CYP3A5-rs776746 (A6986G) and CYP3A5- rs776746 (A6986G) was performed using an allele - specific PCR method.

The results obtained show that the frequency of the heterozygous MDR1 C3435T is significantly higher in COPD patients in comparison to the control group ($p < 0.004$). T allele MDR1 3435 was more common in smokers compared to non-smokers ($p = 0.035$). Within the clinical group, the number of leukocytes and sedimentation were in statistically significant correlation with the presence of altered T-allele of gene polymorphism MDR1 3435 ($p = 0.012$).

The incidence of CYP3A5*1*3 (heterozygous form and homozygous form) was significantly higher in patients with COPD compared to those of the respondents (43.3% vs. 11.6%, $p < 0.001$). The co-morbidity of COPD patients was statistically significantly more common in patients with non-functional CYP3A5 ($p = 0.025$). The pH values were statistically significantly higher in patients with functional form CYP3A5 ($p = 0.046$).

The distribution of the genotype GG, GA and AA-308 TNF- α did not differ statistically in the group of patients with COPD compared to the control group of healthy subjects ($p = 0.268$). The number of neutrophils was statistically significantly higher in patients with COPD GG-308 TNF- α compared to A-allele carriers of this gene polymorphism (GA and AA-308 TNF- α) ($p = 0.067$). The pH value was significantly higher in patients with GG-308 TNF- α genotype carriers compared to carrier A-alleles of this gene polymorphism (GA and AA-308 TNF- α) ($p = 0.016$). The GG-308 genotype TNF- α is the most common in COPD patients with $BMI \leq 18.5$ and in the BMI group of 18-24.9.

Based on the obtained results, it can be concluded that the variant forms of genes encoding enzymes involved in the xenobiotic metabolism - MDR1 C3435T and CYP3A5*3 are significantly more frequently present in patients with COPD compared to the control group of healthy subjects. In addition, the number of leukocytes and sedimentation are in correlation with the changed genetic status of MDR1 C3435T, and comorbidities are significantly more common in patients with non-functional CYP3A5*3. Genetic status of GA-308 TNF- α was statistically significantly related to the number of neutrophils, whereas the presence of T-allele-308 TNF- α was not more common in patients with COPD compared to healthy subjects.

Scientific area: Medicine

Scientific discipline: Pathological physiology, Pulmonology

Key words: COPD, single nucleotide polymorphisms, MDR1, TNF- α , CYP3A5

UDK: 572.22:615:2]:616.24-008.4-092

CERIF Classification: B540 respiratory system

License type creative community: CC BY-NC-ND

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. HRONIČNA OPSTRUKTIVNA BOLEST PLUĆA	3
2.1.1. Definicija.....	3
2.1.2. Prevalencija, morbiditet i mortalitet HOBP	5
2.1.3. Patofiziologija HOBP.....	6
Hipersekrecija sluzi i poremećaj funkcije cilija.....	7
Opstrukcija i hiperinflacija	8
2.1.4. Sistemska inflamacija u HOBP	9
Poremećaj razmene gasova	11
Plućna hipertenzija.....	12
Poremećaj funkcije endotela plućnih krvnih sudova	12
Hronično plućno srce	13
2.1.5. Procena stepena težine bolesti obolelih od HOBP	13
2.1.6. Egzarcebacije HOBP.....	14
2.1.7. Kombinovana procena stepena težine HOBP	15
2.2. ULOGA GENSKIH POLIMORFIZAMA U ETIOPATOGENEZI HOBP	17
2.2.1. Humani MDR1 gen.....	18
MDR1 u HOBP.....	20
2.2.2. CYP3A5	21
CYP3A5 polimorfizam	22
CYP3A5 u hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća.....	22
2.2.3. Faktor nekroze tumora alfa (TNF-alfa).....	24

Indukcija apoptoze	25
Polimorfizam gena za TNF-alfa	26
TNF- α u hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća	26
3. CILJ RADA	28
4. MATERIJALI I METODE	29
4.1. Ispitanici.....	29
4.1.1. Kontrolna grupa.....	29
4.1.3. Klinička grupa.....	30
4.1.3.1. Protokol istraživanja	30
4.1.3.2. Metode spirometrije i anketiranja	30
4.2. Metode	34
4.2.1. Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi.....	34
Genotipizacija polimorfizama CYP3A5 (rs776746) alel-specifičnom PCR metodom	39
5. REZULTATI	42
5.1. Rezultati demografskih i kliničkih parametara kliničke grupe	42
5.2. Učestalost genskih polimorfizama MDR1, C3435T, TNF- α G-308A i CYP3A5*1*3 kod ispitanika kliničke grupe	47
5.2.1. Frekvencija različitih haplotipa MDR, TNF i CYP3A5 polimorfizama kod bolesnika sa HOBP	48
5.3. Rezultati genotipizacije MDR1 C3435T polimorfizma.....	50
5.4. Odnos MDR1 3435CT i 3435TT i kliničkih parametara HOBP bolesnika.....	54
5.5. Polimorfizam TNF alfa gena	56
5.6. Korelacija kliničkih parametara sa prisustvom alela TNF-alfa (-308)GA polimorfizma.....	59
5.7. Rezultati u odnosu na CYP3A5*3*1 polimorfizam	63
5.8. Upoređivanje učestalosti polimorfizama ispitivanih gena između kliničke i kontrolne grupe	68
6. DISKUSIJA	71

7. ZAKLJUČAK.....	79
8. REFERENCE.....	81

1. UVOD

Hronična opstruktivna bolest pluća je sporo progresivna bolest koju karakteriše ograničenje protoka vazduha kroz disajne puteve koje nije u potpunosti reverzibilno (1). Ograničenje protoka vazduha je udruženo sa neadekvatnim inflamatornim odgovorom pluća na štetne gasove ili čestice. Za HOBP se takođe u definiciji koja je data od strane Globalne inicijative za lečenje hronične opstruktivne bolesti pluća (GOLD), navodi da se može lečiti i sprečiti, kao i da postoje značajne vanplućne manifestacije, te shodno tome pridruženi komorbiditeti koji zajedno sa pogoršanjima doprinose sveukupnoj težini bolesti kod svakog pojedinačnog pacijenta (2,3,4).

Prema podacima GOLD-a, procenjuje se da je HOBP trenutno četvrta bolest u svetu po mortalitetu, ali se predviđa da će biti treća do 2020 godine. Više od tri miliona ljudi je umrlo od ove bolesti 2012. godine, što čini 6% svih smrtnih slučajeva na globalnom nivou. Na osnovu BOLD-a (The Burden of Obstructive Lung Diseases) i drugih velikih epidemioških studija predviđa se da će broj smrtnih slučajeva obolelih od HOBP do 2030 godine biti oko 4,5 miliona godišnje. Dakle, smatra se da je hronična opstruktivna bolest pluća jedan od glavnih uzroka hroničnog morbiditeta i mortaliteta širom sveta te da veliki broj ljudi dugi niz godina pati i prerano umire usled njenih posledica. (1)

Proces hronične inflamacije prema novijim istraživanjima ima značajnu ulogu u patogenezi HOBP. Inflamacija dominira u perifernim disajnim putevima i parenhimu pluća i time omogućava povećana ekspresija brojnih inflamacijskih proteina, i to: citokina, hemokina, adhezivnih molekula, inflamacijskih enzima i receptora. U mreži citokina koji učestvuju u inflamaciji vrlo važnu ulogu ima faktor nekroze tumora-alfa (TNF-alfa), koji pripada proinflamatornim citokinima. Proizvode ga aktivirani makrofagi i smatra se da ima kritičnu ulogu u patogenezi HOBP tako što podstiče i održava ekspresiju i oslobađa različite proinflamatorne medijatore što vodi oštećenju tkiva respiratornog trakta i remodelovanju (5,6).

Najznačajniji faktor rizika za nastanak HOBP je pušenje cigareta, međutim svi pušači ne razvijaju HOBP, tako da precizno razumevanje uticaja ovog faktora na patogenezu HOBP i dalje ostaje nedostupno (6). Reč je, najverovatnije o postojanju genetskih varijacija, koje mogu uticati

na osetljivost prema duvanskom dimu. Usled toga se može pretpostaviti da su prisutne genske varijacije najverovatnije dodatni faktor rizika za razvoj HOBP. Istraživanja ukazuju da je moguće da sistem P-glikoproteina (eng.P-glycoprotein,P-gp), kodiran MDR-1 genom (eng.Multidrug resistance proteins, MDR), igra ulogu u otklanjanju toksičnih efekata pušenja i otklanjanju metabolita oksidativnog stresa (7).

Osim navedenog za metabolizam potencijalno toksičnih supstanci u organizmu odgovorni su i enzimi iz sistema citohroma P450 (CYP), veoma značajne enzimske porodice koja ima sposobnost katalizovanja oksidativne biotransformacije mnogobrojnih lekova i drugih lipofilnih ksenobiotika. Neka istraživanja su potvrdila značajnu interakciju između CYP3A5 genotipa, trenutnog pušačkog statusa, forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (FEV1) i simptoma HOBP, što ukazuje na moguću povezanost polimorfizama CYP3A5 i oštećenja disajnih puteva kod pušača (8,9). Navedena dešavanja verovatno dovode do aktivacije hemijskih sastojaka u duvanskom dimu što u daljem toku rezultira promenama u respiratornom traktu i razvoja HOBP (10).

Dosadašnja istraživanja vezana za ovu temu su relativno oskudna, a dobijeni rezultati čak i kontradiktorni. Takođe pojedinačni Single Nucleotide Polymorphism (SNP, polimorfizam jednog nukleotida) mogu objasniti samo deo rizika za nastanak HOBP. Iz tog razloga je veoma značajno da se ispita mogući istovremeni uticaj više različitih SNP-ova, kao i ostali faktori rizika za nastanak hronične obstruktivne bolesti pluća. Zaključci bi nam pomogli u prilagođavanju terapijskog pristupa svakom pojedinačnom pacijentu kako bi terapija bila efikasnija, a neželjeni efekti minimalni.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. HRONIČNA OPSTRUKTIVNA BOLEST PLUĆA

2.1.1. Definicija

Definicija hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) koja se danas koristi je predložena od strane Globalne inicijative za lečenje HOBP (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease-GOLD). Prema njoj se HOBP definiše kao bolest koju možemo da lečimo i preveniramo, a koja se karakteriše perzistentnim respiratornim simptomima i ireverzibilnim ograničenjem protoka vazduha kroz disajne puteve (1). Ograničenje protoka vazduha je posledica postojanja abnormalnosti disajnih puteva i/ili aveola, koje nastaju usled značajnog izlaganja štetnim česticama i gasovima. Važno je da ova bolest ima sistemske manifestacije (1) pa u skladu sa tim i pridružene komorbiditete koji udruženi sa egzacerbacijama doprinose stepenu težine bolesti kod svakog pojedinačnog pacijenta (11,12).

HOBP je bolest hroničnog i progredijentnog karaktera čija incidenca značajno raste u celom svetu (1). Pušenje cigareta je najpoznatiji faktor rizika za nastanak HOBP (13). Međutim, nije i jedini faktor rizika za nastanak ove bolesti. Postoje dokazi da i nepušači mogu razviti hronično ograničenje protoka vazduha kroz disajne puteve (14). Procena stepena težine bolesti HOBP, ali i efikasnost terapijskog tretmana se tradicionalno meri promenama u forsiranom ekspirijumskom volumenu u prvoj sekundi-FEV1 (1). Nepovoljan uticaj pušenja na brzinu opadanja forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (FEV1) potvrđen je i dokumentovan u mnogim studijama u populaciji (15,16). Prestanak pušenja ili ekspozicije duvanskom dimu je jedini način kojim se može prevenirati i donekle usporiti dalja progresija bolesti (15,17) .

U definiciji HOBP-a je navedeno da bolest osim što oštećuje primarno pluća dovodi i do sistemskih posledica u organizmu, usled postojanja hronične sistemske inflamacije. U prilog navedenog je potvrđena činjenica da su kod HOBP-a povišene vrednosti markera inflamacije, leukocita, poremećenog odnosa neutrofila i leukocita (Ne/Ly rate), C-reaktivnog proteina, ali i brojnih citokina u krvi, kao što je faktor nekroze tumora – alfa (TNF-alfa) (5,18). Hronična, sistemska inflamacija može dovesti do oštećenja drugih organa i tkiva, usled kojih verovatno dolazi i do nastanka komorbiditeta (19).

Definicija HOBP uključuje i druge kliničke entitete koji su se ranijih godina koristili za dijagnozu ovog oboljenja, a to su: hronični bronhitis, hronični opstruktivni bronhitis i emfizem.(20)

Hronični bronhitis se definiše kao stanje koje karakteriše postojanje kašlja i iskašljavanja minimum tri meseca u poslednje dve godine i nije obavezno udružen sa ograničenjem protoka vazduha kroz disajne puteve. Naime, hronični bronhitis nije HOBP jer vrlo često spirometrijskim metodama merenja ne daje opstruktivni poremećaj ventilacije pluća. Treba naglasiti da hronični bronhitis ne mora uvek progredirati do HOBP, kao i da se patofiziološki umnogome razlikuju (21, 22).

Hronični opstruktivni bronhitis je kliničko stanje koje osim simptoma bolesti poseduje stalnu opstrukciju disajnih puteva koja se verifikuje spirometrijom, a gde je odnos forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi i forsiranog vitalnog kapaciteta ($FEV1/FVC \times 100\%$) manji od 70% od predviđene norme.

Emfizem pluća se definiše kao trajno uvećanje disajnih puteva distalno od terminalnih bronhiola sa destrukcijom zida alveola. Često se u kliničkoj praksi poistovećuje sa HOBP-om što je apsolutno netačno, ali svakako predstavlja patohistološki termin koji opisuje samo jedan u nizu strukturnih poremećaja koji postoje i koji se dešavaju tokom razvoja i nastanka HOBP (23). Postoje dve vrste emfizema: centrolobularni i panlobularni emfizem pluća. Centrolubularni emfizem pluća se najčešće javlja kod pušača, a dešava se zbog dilatacije ili destrukcije respiratornih bronhiola. Panlobularni emfizem pluća je često udružen sa deficitom alfa 1-antitripsina, a posledica je dilatacije ili destrukcija svih lobulusa (23,24).

Sve navedene bolesti imaju zajedničke kliničke i patološke poremećaje, ali su posledica različitih patofizioloških mehanizama, te se ne mogu koristiti kao sinonimi za HOBP u kliničkoj praksi.

Mnogo preciznija je definicija HOBP data od strane GOLD-a, koja kaže da se HOBP karakteriše ireverzibilnim ograničenjem protoka vazduha kroz disajne puteve, a da je bronhoopstrukcija predstavljena odnosom $FEV1/FVC$ koji je manji od 70%, a koji je meren spirometrijski postbronhodilatatorno (25). Ove kriterijume je prihvatilo Evropsko Respiratorno Udruženje (Engl. European Respiratory Society-ERS) i Američko Torakalno Udruženje (engl. American Thoracic Society-ATS) (26). Iako je navedeni odnos veoma praktičan za kliničku primenu u dijagnozi HOBP, mnoge studije, kao što su studija Schermera i saradnika (27) su pokazale da

ukoliko koristimo navedeni odnos $FEV1/FVC < 70\%$, možemo preценiti opstrukciju disajnih puteva kod osoba koje su starije životne dobi, a potceniti kod osoba koje su mlađe životne dobi.

U novije vreme revidirana GOLD smernica navodi da za dijagnozu HOBP nije dovoljno samo jedno merenje postbronhodilatatorno $FEV1/FVC < 70\%$, ukoliko se ta vrednost kreće od 60 do 80%, spirimetriju treba ponoviti, jer se taj odnos može promeniti kao rezultat biološke varijacije pri merenju u kasnijem intervalu (28,29). Međutim, ako je početni odnos postbronhodilatatorni $FEV1/FVC < 60\%$, onda je malo verovatno da će doći do spontanog povećanja iznad 70%, tako da ga u tom slučaju ne treba ponavljati (29).

Prema GOLD kriterijumima, HOBP se klasifikuje u četiri stadijuma, a prema postbronhodilatatornim vrednostima FEV1, a pod uslovom da je odnos $FEV1/FVC < 70\%$ (1):

GOLD 1 – Blaga HOBP kada je FEV1 veći ili jednak od 80% od predviđene vrednosti

GOLD 2 – Srednje teška(umerena) HOBP kada je FEV1 od 79 do 50% predviđene vrednosti

GOLD 3 – Teška HOBP kada je FEV1 od 49% do 30% od predviđene vrednosti

GOLD 4 – Vrlo teška kada je FEV1 manji od 30 % predviđene vrednosti

2.1.2. Prevalencija, morbiditet i mortalitet HOBP

Dostupni podaci o prevalenciji HOBP se veoma razlikuju usled postojanja bitnih razlika u metodama istraživanja, dijagnostičkim kriterijumima i analitičkim postupcima. Procena prevalencije se zasniva isključivo na podacima o rezultatima spirometrije. Prevalencija HOBP se povećava sa starošću i pet puta je veći rizik za osobe starije od 65 godina, u poređenju sa osobama koje su mlađe od 40 godina (30).

Na osnovu brojnih istraživanja u periodu od 1990. do 2004.godine kojima je obuhvaćeno 28 zemalja, ukupna prevalencija HOBP je iznosila 7,5% u 37 studija. Utvrđeno je da se prevalenca HOBP povećava sa godinama starosti naročito kod pušača i bivših pušača, kao i da HOBP češće imaju muškarci u odnosu na žene (30,31,32). Značajan je Latino Američki Projekat za Istraživanje HOBP- PLATINO (33) koji je sproveden u pet velikih zemalja Latinske Amerike: Brazil, Čile, Meksiko, Urugvaj i Venecuela. Prevalenca za HOBP je iznosila 7,8% u Meksiko Sitanju, do 19,7 % za Montevideo (33).

Na osnovu Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) i drugih velikih epidemioloških studija, procenjuje se da je broj slučajeva HOBP u 2010 godini bio 384 miliona sa globalnom prevalencijom od 11,7% (34). Globalno godišnje je oko 3 miliona umrlih od HOBP (35). Sa rastućom prevalencijom pušenja u zemljama u razvoju i starenjem populacije u zemljama sa visokim dohotkom očekuje se da će doći do porasta prevalencije HOBP-a u narednih 30 godina, a do 2030 godine može doći do čak 4,5 miliona smrtnih slučajeva usled HOBP (36,37).

Na osnovu dostupnih podataka se može zaključiti da se morbiditet kod HOBP povećava sa godinama (32,33,38). Pridružene bolesti (39), značajno narušavaju zdravstveni status pacijenata, često su glavni razlog hospitalizacije i predstavljaju velike troškove i teškoće prilikom lečenja HOBP pacijenata (40,41,42,43,44)

HOBP je jedan od najvažnijih uzroka smrti u većini zemalja (45). Na primer u 2011. godini HOBP je bio treći vodeći uzrok smrti u Sjedinjenim Državama (46). To povećanje mortaliteta HOBP pacijenata je povezano sa epidemijom pušenja cigareta, zatim sa smanjenjem smrtnih ishoda od drugih hroničnih bolesti (ishemijska bolest srca, infekcije), potom zbog starenja svetske populacije, posebno u zemljama okruženja, ali i zbog nedostatka efikasne terapije koja bi modifikovala ovu bolest (1). Međutim, neprepoznavanje, a samim tim i nedijagnostikovanje HOBP smanjuje tačnost podataka o HOBP (47,48,49). HOBP je prema podacima iz studije GBD (Golden Burden of Disease), a pod pokroviteljstvom WHO (World Health Organization), četvrti uzrok smrti u svetu sa 2,75 miliona umrlih, od čega su 1,41 miliona muškarci, a 1,34 miliona žene. U budućnosti se predviđa dalji porast smrtnosti u svetu (35). Podaci o mortalitetu potcenjuju HOBP kao uzrok smrti zbog toga što se često predstavlja da HOBP nije osnovno oboljenje, nego da je pridružena bolest ili komorbiditet, pa da je samo doprinela smrti, ili se pak uopšte ne spominje (39,40).

2.1.3. Patofiziologija HOBP

Patoanatomske promene koje nastaju u toku evolucije HOBP se verifikuju u velikim disajnim putevima, malim disajnim putevima, alveolama i plućnoj vaskulaturi. S vremenom dovode do odgovarajućih patofizioloških poremećaja od kojih su najznačajniji hipersekrecija sluzi, poremećaj funkcije cilija, ograničenje protoka vazduha kroz disajne puteve, plućna hiperinflacija, poremećaj razmene gasova, razvoj plućne hipertenzije, hroničnog plućnog srca i udaljeni,

sistemske efekte. Uprkos velikoj raznolikosti patoanatomskih promena i njihovoj rastprostranjenosti, često se uočava da postoji slaba korelacija između njih, a razlog ove disproporcije je što nije uvek moguće obezbediti adekvatan i dovoljno veliki uzorak, kao i zbog nepostojanja precizne patoanatomske metodologije. Navedeni događaji su odgovorni za ispoljavanje najčešćih simptoma HOBP tj. kašlja sa iskašljavanjem i dispneje.

Kod HOBP dolazi do postepenog i progresivnog smanjenja plućne funkcije koje se ogleda u stalnom i progresivnom smanjenju forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (FEV1) kao i odnosa FEV1/FVC (50). Naime, smanjenje FEV1 nastaje usled snižavanja forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC), uz istovremeni pad odnosa FEV1/FVC. Sniženje ovog odnosa se javlja zbog gubitka elastične retraktilne sile pluća, odnosno usled emfizema, kao i opstrukcijom malih disajnih puteva (51). FVC se smanjuje zbog zarobljavanja vazduha opstrukcijom u malim disajnim putevima i porasta rezidualnog volumena (RV) kada nastaje hiperinflacija plućnog parenhima. Porastom RV, mnogo više nego TLC, u daljem toku dolazi i do pada VC, te pojave dispneje kod obolelog (52,53). Upravo zbog zarobljavanja vazduha dolazi do pada FEV1, a u daljem razvoju bolesti i vitalnog kapaciteta (VC). Stoga u terapiji HOBP težimo da smanjimo količinu zarobljenog vazduha, snižavamo RV, kao i RV/TLC, usled čega dolazi do porasta FVC, te je uvećanje FEV1 sekundarna pojava (54).

Hipersekrecija sluzi i poremećaj funkcije cilija

Hipersekrecija sluzi i poremećaj funkcije cilija predstavljaju najraniji patofiziološki poremećaj koji se razvija u HOBP. Nastaju zbog stimulacije hipertrofičnih sluznih žlezda i povećanog broja peharastih ćelija inflamatornim medijatorima poput leukotriena, proteaza i neuropeptida što dovodi do hipersekrecije mukusa i izmenjenih reoloških karakteristika mukusa. Istovremeno duvanski dim dovodi do pareze cilija, zbog čega nastaje zastoj sekreta u malim disajnim putevima uz istovremenu hipersekreciju. Nagomilavanje i stagnacija sekreta koji je viskozan, žilav i lepljiv u malom disajnim putevima dovodi do stvaranja čepića sluzi koji mogu potpuno zatvoriti disajne puteve. Navedena dešavanja pogoduju kolonizaciji bakterijama, rekurentnim bronhijalnim infekcijama kao i razvoju pneumonija, što u daljem toku bolesti omogućava održavanje inflamatornog procesa i hipersekreciju (55). Nagomilani sekret i sluzni čepići u malim disajnim putevima imaju značajnu ulogu u nastanku opstrukcije protoku vazduha kroz disajne puteve (56). Dokazano je da je hronična hipersekrecija mukusa udružena sa smanjenjem FEV1

kod HOBP i da je ovo smanjenje proporcionalno stepenu hipersekrecije mukusa (57). Treba napomenuti da neki medijatori i proteaze stimulišu hipersekreciju mukusa i mnogi od njih postižu efekte aktivacijom receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) (58,59).

Opstrukcija i hiperinflacija

Glavna patofiziološka promena u HOBP je ograničenje protoka vazduha, odnosno opstrukcija koja je uglavnom ireverzibilna sa veoma malom reverzibilnošću (60,61). Ireverzibilno ograničenje protoka vazduha se dešava primarno zbog remodelovanja malih disajnih puteva. Remodelovanje obuhvata fibrozu, povećanje glatkomišićne mase zida disajnih puteva i hiperplaziju peharastih ćelija (62). Redukcija protoka vazduha u HOBP ima dve važne komponente: povećanje otpora i gubitak elastične retraktilne sile pluća. Povećanje otpora je prisutno uglavnom u perifernim disajnim putevima iako su patološke promene prisutne u centralnim disajnim putevima. Treba naglasiti da je povećanje otpora izraženije u ekspirijumu što vodi produženju ekspirijuma i sve većem zarobljavanju vazduha u alveolama (63). Povećanje otpora zahteva dodatni disajni rad što dovodi do poraste energetske potrošnje, a kasnije zamora disajne muskulature. Destrukcija plućnog parenhima takođe učestvuje u opstrukciji disajnih puteva redukcijom elastične sile pluća, što smanjuje intraalveolarni pritisak koji pomaže ekspirijum (64,65).

Gubitkom elastične retraktilnosti disajni putevi ranije kolabiraju u ekspirijumu te na taj način povećavaju količinu zarobljenog vazduha u plućima i povećavaju funkcionalni rezidualni kapacitet (FRC) i rezidualni volumen (RV). Smanjenje dinamičke komplijanse takođe dovodi do razvoja hiperinflacije. Dinamička hiperinflacija se razvija kada je intenzitet opstrukcije takav da je trajanje ekspirijuma nedovoljno dugo, te se ne može istisnuti sav vazduh iz predhodnog ekspirijuma. Iz tog razloga sledeći inspirijum počinje pre završetka predhodnog ekspirijuma (66).

Najčešći uzroci reverzibilnog ograničenja protoka vazduha jesu inflamatorni procesi u disajnim putevima, kontrakcija glatkih mišića u perifernim i centralnim disajnim putevima i nakupljanje sluzi i eksudata u lumenu disajnih puteva.

U početnoj fazi bolesti tokom niza godina ne mora postojati pad FEV1 i FEV1/FVC odnosa. Međutim, dolazi do uvećanja RV, TLC i RV/TLC, te se postepeno smanjuje elastična sila pluća,

naročito pri višim volumenima. Zbog toga vitalni kapacitet ostaje normalan ili povišen. Daljom progresijom HOBP dolazi do opstrukcija protoka vazduha kroz disajne puteve koji se otkriva smanjenjem FEV1 i FVC. Remodelovanje disajnih puteva postaje izraženije, sile elastične retraktilnosti su sve manje, što vodi daljem smanjenju FEV1 i FVC, a u daljoj evoluciji i VC. U početku bolesti ekspirijumski protoci su sniženi tokom fizičkog napora, a kasnije, sa progresijom bolesti dolazi do njihovog ograničenja i pri mirnom disanju (57,61).

2.1.4.Sistemska inflamacija u HOBP

Brojne studije su poslednjih decenija ukazale na vrlo značajnu ulogu procesa hronične inflamacije u patogenezi HOBP. Inflamacijski proces kod ove bolesti dominira u perifernim disajnim putevima i parenhimu pluća ali se može naći i u velikim disajnim putevima. Međutim, hroničnu opstruktivnu bolest pluća karakteriše sistemska inflamacija plućnog tkiva koja se javlja kao posledica dejstva udahnutih, štetnih gasova i čestica, kao što je duvanski dim. Čak i nakon prestanka pušenja inflamacija pluća se nastavlja nepoznatim mehanizmima, pa se pretpostavlja da autoantigeni mogu igrati ulogu u tome (67,68). U početku je inflamacija vrlo niskog intenziteta i liči na inflamaciju u drugim sistemskim bolestima, tako da u stvari predstavlja fiziološki odgovor na štetne agense. Ta fiziološka reakcija pre svega ima cilj zaštitu plućnog tkiva i funkcije pluća. Ali ako duže traje dovodi do prekomernog inflamacijskog odgovora, te prestaje prvobitno zaštitno fiziološko dejstvo inflamacije, kada dolazi do oštećenja tkiva (69).

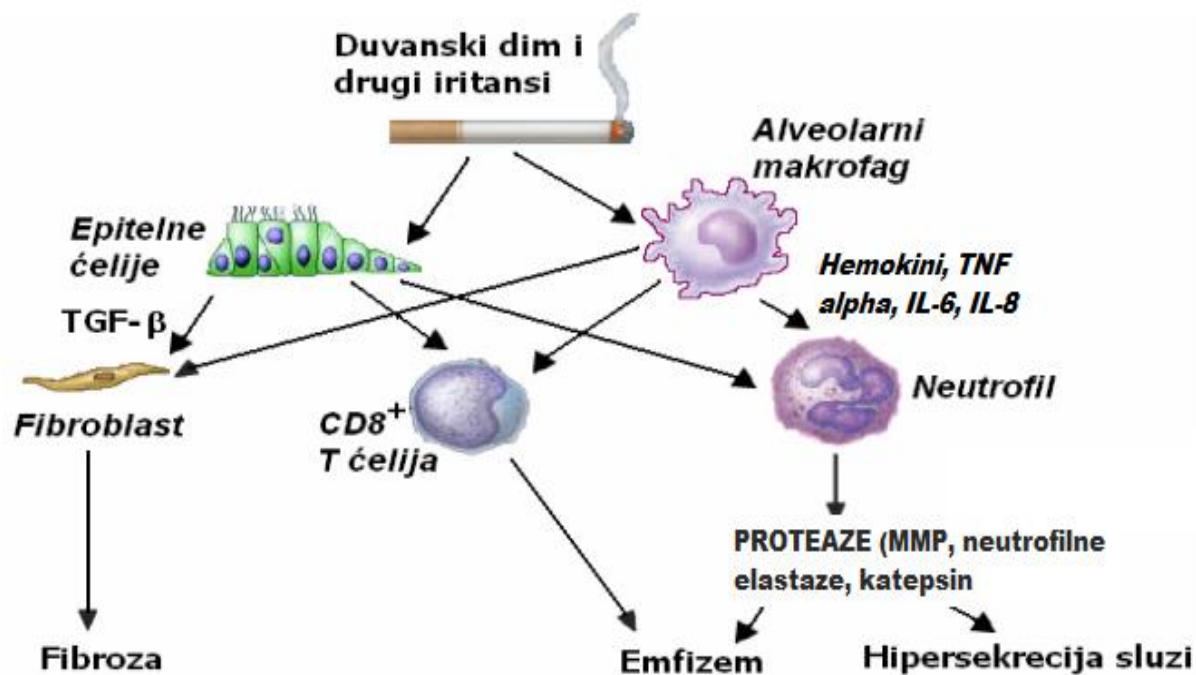
U tkivu pluća se dešava inflamacijski odgovor kojeg karakteriše:

1. povećanje broja neutrofila, makrofaga i CD8+ T-limfocita
2. povećanje koncentracije proinflamacijskih citokina (IL-8, TNF-alfa)
3. oksidativni stres

Vrlo slične promene su nađene i u perifernim tkivima i organima obolelih od HOBP, što je pokazalo da je HOBP sistemska inflamatorna bolest (69,70).

Treba naglasiti da u početnom stadijumu HOBP-a u plućima postoji reverzibilna inflamatorna reakcija. Tada nastaje oštećenje epitela disajnih puteva koje nastaje usled direktnog dejstva štetnih čestica i gasova ili dejstvom slobodnih kiseoničnih radikala (ROS). Respiratorni iritansi

prolaze kroz oštećeni epitel, te direktno aktiviraju alveolarne makrofage, čime počinje proces inflamacije u plućima (67). Aktivirani makrofagi kao i oštećene epitelne ćelije oslobađaju neutrofilne hemokine koji stimulišu privlačenje neutrofila i monocita i proinflamatorne citokine (tumor necrosis factor - TNF-alfa i interleukin 8 - IL-8) kao i matriks metaloproteinazu (matrix metalloproteinases - MMPs)(71,72). Proinflamatorni citokini, kao što je TNF- α , uzrokuju, a i održavaju inflamaciju stvaranjem drugih citokina. Aktivaciju makrofaga pojačavaju intraepitelni T-limfociti tako što na svojoj površini ekspimiraju efektorski molekul CD40 ligand koji se vezuje CD40 receptor na makrofagima uz istovremenu sekreciju interferona gama (INF-gama), izuzetno važnog citokina za aktivaciju makrofaga. Tako oslobođeni neutrofilni citokini omogućavaju nakupljanje neutrofila u plućima i njihovu aktivaciju (67,73) Neutrofili prelaze iz sistemske u plućnu cirkulaciju i adheriraju se za endotelijalne ćelije alveolarnog zida. Aktivirani neutrofili sekretuju različite proteaze kao što su neutrofilna elastaza, neutrofilni katepsin G i neutrofilna proteaza-3. Makrofagalna MMPs i neutrofilna elastaza razgrađuju elastin u zidu alveola. Tome se suprotstavlja sistem antiproteaza, alfa -1 antitripsin i tkivni inhibitor metaloproteinaze (slika 3). U daljem toku procesa dolazi do inaktivacije ovih antiproteaza od strane neutrofilne elastaze i MMPs, što dovodi do destrukcije plućnog tkiva i hipersekrecije mukusa (74). Epitelne ćelije i makrofagi sekretuju transformišući faktor rasta koji dovodi do povećanja broja fibroblasta i njihove aktivacije (69,59,75). Ako je dejstvo štetnih čestica i gasova dugotrajno, inflamacija postaje hronična i ireverzibilna. Hronična infamacija dovodi do produžene aktivacije i povećanje broja fibroblasta te remodelovanja i suženja malih disajnih puteva, kao i destrukcije plućnog parenhima (76,77).



Slika 1. Prikaz sistemske inflamacije u HOBP, modifikovano iz Bousquet J (78)

Oksidativni stres može biti jedan od vrlo važnih pojačavajućih u mehanizama kod HOBP (67,77). Oksidansi se stvaraju uslijed dejstva duvanskog dima i drugih udahnutih čestica i oslobađaju iz aktiviranih inflamatornih ćelija, kao što su makrofagi i neutrofilni. Moguće da smanjenje endogenih antioksidanasa kod HOBP pacijenata je rezultat smanjenog nivoa transkripcionog faktora Nrf2 koji reguliše brojne antioksidantne gene (79,80).

Inflamacija u HOBP dovodi ne samo do plućnog oštećenja, već i do oštećenja udaljenih organa i tkiva. Usled toga dolazi do sistemskih efekata u HOBP.

Poremećaj razmene gasova

Poremećaj razmene gasova kod HOBP nastaje usled neusklađenosti ventilacije i perfuzije pluća (V/Q). U kasnijem toku bolesti dolazi do redukcije plućne vaskularne mreže što dodatno utiče na abnormalnost V/Q odnosa (80). Na metabolizam respiratornih gasova utiču i ekstrapulmonalni faktori, a to su: inspiratorna frakcija kiseonika, hemodinamski status, minutni volumen srca, metabolički zahtevi organizma i alvelarna hipoventilacija.

Naime, kod uznapredovale HOBP usled opstrukcije perifernih disajnih puteva, parenhimske destrukcije i poremećaja plućne vaskulature dolazi do smanjenja kapaciteta pluća za razmenu gasova te do hipoksemije, a kasnije i hiperkapnije. Hipoksemija u početku postoji samo pri fizičkom naporu, međutim daljom progresijom bolesti ona postoji i u miru (57). U delovima pluća u kojima je V/Q odnos snižen nastaje i hiperkapnija koja se u početnim fazama može kompenzovati povećanjem ventilacije (53). U odmaklim fazama bolesti kada se pojačano mogu ventilirati samo mali delovi plućnog parenhima, uz hipoksemiju se razvija i stalna hiperkapnija (61).

Plućna hipertenzija

Plućna hipertenzija (PH) je glavna kardiovaskularna komplikacija HOBP i udružena je sa razvojem hroničnog plućnog srca i lošom prognozom. Glavna karakteristika PH je da je u miru sistolni pritisak u plućnoj arteriji iznad 30 mmHg (3,3kPa), dijastolni pritisak iznad 10 mmHg, odnosno srednji pritisak iznad 20 mmHg (2,66kPa).

PH se može razviti kasnije u toku bolesti, a posledica je hipoksične vazokonstrikcije u malim plućnim arterijama, kada postepeno dolazi strukturalnih promena u vidu hipertrofije/hiperplazije intime, tzv remodelovanja (88,89). Ne zna se tačan podatak o incidenci PH kod HOBP, ali se zna na osnovu indirektnih pokazatelja da je ona vrlo visoka (82,83,84).

Poremećaj funkcije endotela plućnih krvnih sudova

Disfunkcija endotela krvnih sudova pluća prisutna je u terminalnom stadijumu HOBP, ali se nalazi i u blagoj HOBP. Kada dođe do oštećenja endotelijalne funkcije dolazi i do promena u ekspresiji i oslobađanju vazoaktivnih medijatora. Pacijenti sa hroničnom hipoksičnom vazokonstrikcijom imaju smanjenu produkciju i/ili oslobađanje azot oksida (NO) iz endotelnih ćelija što smanjuje mogućnost relaksacije plućne vaskulature (85,86). Kod pacijenata sa HOBP i sa PH je ustanovljeno i smanjenje koncentracije prostaciklina, koji takođe sintetišu endotelne ćelije.

U pacijenata sa HOBP nađena je povećana ekspresija Endotelina-1 (Endothelin-1, ET-1) u plućnim arterijama. Za razliku od prethodno navedenih medijatora, ET-1 je snažan

vazokonstriktor koji ima izražen mitogeni efekat na glatkomišićne ćelije posredovan povećanjem slobodnih radikala (86,87,88,89).

Hronično plućno srce

Hronično plućno srce se definiše kao hipertrofija desne komore usled bolesti koje oštećuju funkciju i/ili strukturu pluća, često je udružena sa plućnom hipertenzijom. Međutim autopsijske studije su pokazale da je hipertrofija desnog srca nađena u preko 40% obolelih od HOBP, ali kod nekih bolesnika je funkcija desne komore očuvana i pored postojanja plućne hipertenzije (90,91).

2.1.5. Procena stepena težine bolesti obolelih od HOBP

Za procenu težine HOBP, GOLD daje procenu težine uzimajući u obzir težinu opstrukcije posle bronhodilatatornog testa doziranim aerosolom u spreju, odnosno postbronhodilatatorni FEV1 i $FEV1/FVC \leq 0,7$.

Postoje četiri stadijuma bolesti:

- 1. Blaga HOBP (GOLD 1): $FEV1/FVC \leq 70\%$, $FEV1 \geq 80\%$, ponekad kašalj sa iskašljavanjem sputuma.**
- 2. Srednje teška ili umerena HOBP (GOLD 2): $FEV1/FVC \leq 70\%$, $50\% \leq FEV1 < 80\%$; sa otežanim disanjem pri naporu.**
- 3. Teška HOBP (GOLD 3): $FEV1/FVC \leq 70\%$, $30\% \leq FEV1 < 50\%$; sa malo težim nedostatkom vazduha, smanjenim podnošenjem napora i ponavljanjem egzacerbacija.**
- 4. Vrlo teška HOBP (GOLD 4): $FEV1/FVC \leq 70\%$, $FEV1 \leq 30\%$ ili $FEV1 \leq 50\%$ sa HRI. Ovde su pogoršanja značajno češća i mogu da ugroze život, tako da je obzirom na sve kvalitet života loš (1).**

Procena stepena težine bolesti HOBP, ali i efikasnost terapijskog tretmana se tradicionalno meri promenama u FEV1 (28,29,92). Spirometrija ima centralnu ulogu u dijagnostici, ali ne može u potpunosti da oslika pravo zdravstveno stanje obolelog od HOBP (1). Kod pacijenata su prisutni brojni simptomi kao što su kašalj, iskašljavanje, stezanje u grudima, dispneja, a usled sistemske inflamacije i brojni ekstrapulmonalni simptomi i znaci bolesti, koji ne mogu biti prikazani spirometrijskim merenjem, već zahtevaju komunikaciju sa pacijentom jer jedino mogu biti

adekvatno prikazani iz njegovog ugla (93,94,95). Kašalj, kratak dah, loš san često imaju negativne fizičke, emocionalne i socijalne efekte na pacijenta (94,95,96,97). Treba pomenuti i disfunkciju skeletnih mišića koja predstavlja jedan od ekstrapulmonalnih karakteristika bolesti, koji može značajno da doprinese smanjenju fizičkog kapaciteta, a posledica je narušavanje psihosomatskog zdravstvenog statusa bolesnika (98,99). Stoga da bismo obezbedili detaljan pregled efekata terapijskog tretmana i stepena težine HOBP u kliničkom ispitivanju, neophodno je da spirometrija bude praćena upitnicima kao što su (COPD Assesment Test)) CAT i (Modified Medical Council Research) mMRC-dispneja skala, koji nam mogu omogućiti značajno bolju procenu zdravstvenog stanja pacijenta, usled detaljne analize simptoma koje pacijent oseća (1). Na ovaj način se beleže iskustva svakog pojedinačnog bolesnika, bez tumačenja od strane trećeg lica, kao što su zdravstveni radnici. Najznačajniji simptomi koji nam pomažu u razumevanju uticaja HOBP na život pacijenta iz njihove sopstvene perspektive su: kratak dah, zamor, kašalj, iskašljavanje, fizičko, socijalno funkcionisanje i san. Upravo iz tog razloga ove karakteristike bolesti se nalaze u upitniku koji ispunjava sam bolesnik jer najviše utiču na pacijenta.

CAT je razvijen 2009.godine po standardima Američke agencije za hranu i lekove (FDA). CAT je kratak i jednostavan, prilagođen našem jeziku, a obuhvata osam stavki koji pokrivaju širok spektar uticaja HOBP na bolesnika. Uprkos svojoj kratkoći pruža pouzdanu meru težine HOBP, te se može rutinski koristiti (99).

Postoji više upitnika za procenu dispneje, ali je najčešće u upotrebi The Modified Medical Research Council Dyspnea Scale (mMRC-dispnea skala), koji je zapravo revidirana verzija testa Saveta za medicinska istraživanja dispneje. Ova test je veoma jednostavan za izvođenje, validan i dobro kolerira sa kliničkim kao i sa parametrima plućne funkcije (100).

Globalna inicijativa za HOBP u svojim smernicama preporučuje korišćenje CAT i mMRC – dispneja skalu za procenu simptoma kod bolesnika sa HOBP (1). Oni zajedno sa parametrima plućne funkcije i brojem pogoršanja svrstavaju pacijente u 4 grupe A, B, C i D, na osnovu kojih se procenjuje rizik od pogoršanja bolesti u budućnosti (1).

2.1.6.Egzarcebacije HOBP

Za procenu težine HOBP, pored navedenih parametara, vrlo su bitna i pogoršanja - egzacerbacije tj. epizode pogoršanja respiratornih simptoma koji narušavaju zdravstveni status pacijenata, a koji

su značajan uzrok mortaliteta ove bolesti (101,102,103). Takođe se navodi da u akutnim pogoršanjima HOBP postoji realna potreba za izmenom u terapiji obolelog (104,105). Prema novim smernicama GOLD-a pogoršanja se dele na: blaga (engl. mild), koja zahtevaju terapiju sa kratkodelujućim beta 2 agonistima, potom umerena (engl.moderate) koji u terapiji zahtevaju ne samo kratkodelujuće beta 2 agoniste, već i antibiotioke i /ili oralne kortikosteroide i teške (engl.severe), gde su pacijenti hospitalizovani ili su bili tretirani u hitnim medicinskoj službi. Teška pogoršanja takođe mogu biti u vezi sa akutnom respiratornom insuficijencijom.Trebalo bi naglasiti da su teška pogoršanja HOBP u vezi sa lošom prognozom i povećanim rizikom smrtnog ishoda (106).

Stepen težine	
Blaga	Pacijent ima potrebu za medikamentima, ali se može lečiti sam, u kućnim uslovima.
Umerena	Pacijent ima povećanu potrebu za medikacijom, ali i potrebu za medicinskom asistencijom.
Teška	Pacijent ili njegov staratelj prepoznaje akutno pogoršanje stanja koje obavezno zahteva hospitalizaciju.

Postoji potreba za određenom subklasifikacijom HOBP egzacerbacija iz praktičnih razloga, koja je predstavljena tabelom 1.

Tabela 1. Klasifikacija HOBP egzacerbacija zasnovana na resursima zdravstvene zaštite

2.1.7.Kombinovana procena stepena težine HOBP

Za procenu stepena težine HOBP, osim spirometrije koriste se simptomi i rizik od budućih egzacerbacija. Ovaj način procene je neophodan da bismo u potpunosti shvatili ozbiljnost HOBP i imali individualan pristup prema obolelima . U tom pogledu učinjen je veliki iskorak 2011 godine ,kada je spirometrija kao način gradiranja udružena sa izvještajima pacijenta. Tada je

podvučen i značaj prevencije egzacerbacija u tretmanu HOBP. U tom pogledu uvedena je ABCD procena. Međutim u daljem toku su mnoga istraživanja pokazala da se ova procena nije pokazala boljom od spirometrijske gradacije za predviđanje mortaliteta ili drugih važnih posledica HOBP (107,108,109). Štaviše, prikazani rezultati grupe D su bili modifikovani sa dva parametra, funkcija pluća i/ili istorija egzacerbacija što je dovelo do nerazumevanja (110). Da bi se izbegle takve posledice tumačenja rezultata, a da bi se zadržala konzistentnost i jednostavnost za kliničare predloženo je preuređenje ABCD procene, kojom se razdvaja spirometrijska procena (GOLD gradacija) od grupa ABCD. Shodno tome će se ubuduće ABCD klasifikacija isključivo koristiti za procenu simptoma pacijenata i istoriju egzacerbacija. U revidiranoj šemi neophodna je spirometrija, ali se uz to procenjuju dispneja na osnovu mMRC dispnea skale i svi ostali simptomi koristeći CAT. Konačno, neophodno je evidentirati umerene i ozbiljne egzacerbacije kao i broj hospitalizacija u istoriju bolesti pacijenata.

Na osnovu simptoma i pogoršanja razlikuju se sledeće grupe:

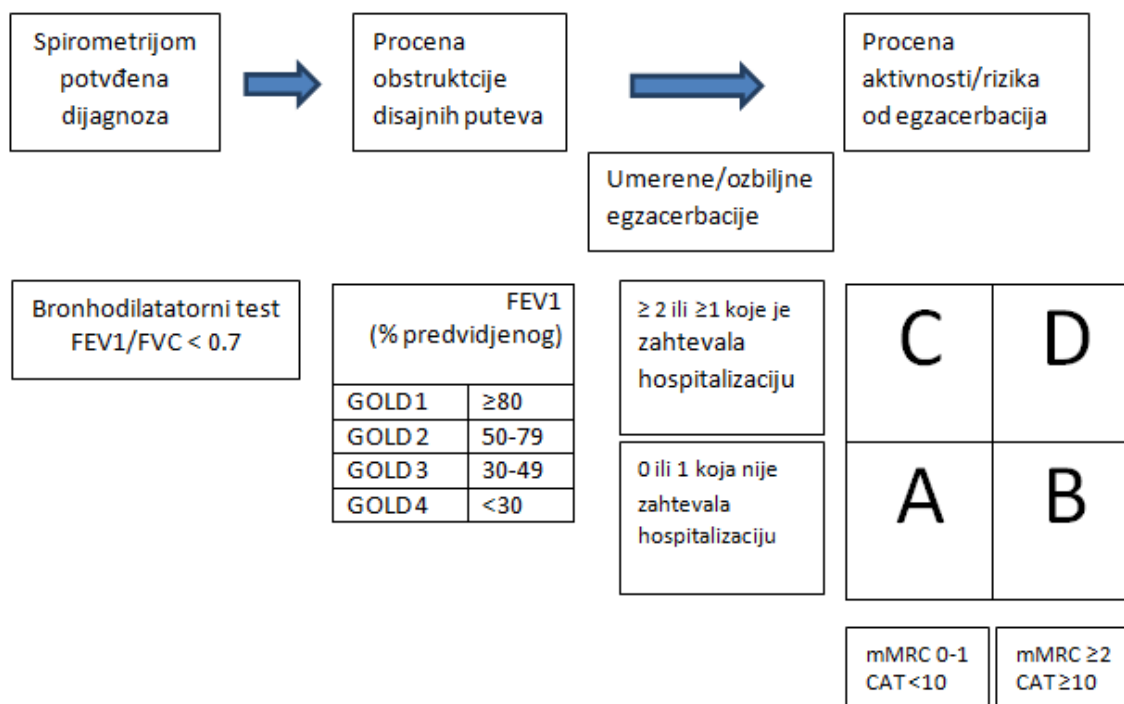
Pacijenti Grupe A- nizak rizik, malo simptoma 0-1 egzacerbacija za jednu godinu i mMRC gradus 0-1 ili CAT skor <10.

Pacijenti Grupe B- nizak rizik, mnogo simptoma 0-1 egzacerbacija za jednu godinu i mMRC gradus ≥ 2 ili CAT ≥ 10 .

Pacijenti grupe C- visok rizik, malo simptoma ≥ 2 egzacerbacija za jednu godinu i mMRC gradus 0-1 ili CAT skor <10.

Pacijenti Grupe D- visok rizik, mnogo simptoma ≥ 2 egzacerbacije za jednu godinu i mMRC gradus ≥ 2 ili CAT skor ≥ 10 .

Postoje sledeći brojni dokazi koji podržavaju ovaj klasifikacioni sistem (111,112,113). Čak i u odsustvu čestih egzacerbacija pacijenti koji pripadaju kategoriji GOLD 3 ili GOLD 4 mogu biti u većem riziku od prijema u bolnicu i smrtnog ishoda, tako da je važno da takvi pacijenti budu uključeni u grupu pacijenata sa Visokim Rizikom. Modifikovana klasifikacija u poslednjoj smernici GOLD-a je predstavljena sledećom slikom 2:



Slika 2. Kombinovana procena stepena težine HOBP (GOLD)

FEV1 – forsirani ekspiratorni volume u prvju sekundi, FVC forsirani vitalni kapacitet, GOLD- globalna inicijativa za HOBP (global initiative for chronic obstructive lung disease), CAT HOBP test procene aktivnosti (COPD assessment test), mMRC modifikovana skala dispneje (modified medical reasech council dyspnea scale)

2.2. ULOGA GENSKIH POLIMORFIZAMA U ETIOPATOGENEZI HOBP

Polimorfni genski lokus je mesto u genomu na kome postoje najmanje dva alela čija je frekvencija u populaciji veća od 1%, za razliku od retkih varijanti, čija učestalost je manja od 1% (114). Zavisno od strukture nukleotida, varijante u humanom genomu mogu se podeliti na polimorfizme jednog nukleotida i strukturne varijante (115). Single nucleotide polymorphism (SNP, polimorfizam jednog nukleotida) je jedan od važnih izvora polimorfnog diverziteta genoma, i predstavlja zamenu jedne baze drugom na preciznoj lokaciji unutar genoma. Mogu biti lokalizovani u kodirajućem ili nekodirajućem regionu DNK (116). Oni SNP-ovi koji se javljaju u kodirajućim regionima označavaju se kao cSNP. Procenjuje se da se na svakih 300 baza javlja po jedan SNP, pa se smatra da u ljudskom genomu ima oko deset miliona SNP-a (117), od čega

oko 7 miliona ima učestalost retkog alela (engl. Minor Allele Frequency, MAF) veću od 5% (115). Procenjuje se da je oko 10% svih SNP-ova funkcionalno, što može dovesti do promena u biološkim procesima, ali prisustvo SNP u kodirajućim sekvencama ne mora obavezno dovesti do promene sekvence aminokiselina u molekulu proteina.

Za razliku od SNP-ova lokalizovanih u kodirajućim sekvencama, SNP-ovi lokalizovani u nekodirajućim sekvencama DNK mnogo su češći. Ovi SNP-ovi ne utiču na sintezu proteina, ali mogu uticati na alternativnu obradu transkripta, vezivanje transkripcionih faktora, degradaciju informacione RNK ili na sekvencu nekodirajuće RNK.

Polimorfizmi DNK imaju varijabilni uticaj na strukturu i funkciju ćelija. Najveći broj polimorfizama ima potpuno neutralni efekat na ćeliju. Međutim, pojedine polimorfne sekvence doprinose predispoziciji osoba za razvoj multifaktorijskih bolesti (118,119). Kod tih bolesti, za razvoj određenog fenotipa, uz faktore spoljašnje sredine, značajan je istovremeni uticaj više gena. Ograničavajući faktor u identifikaciji gena odgovornih za nastanak ovih bolesti jeste i to što povezanost određenih SNP-ova sa bolešću u jednoj populaciji najčešće nije primenljiva i na pripadnike druge populacije zbog postojećih etničkih i drugih razlika (115).

2.2.1. Humani MDR1 gen

Uočeno je da neki endogeni faktori utiču na metabolizam toksičnih supstanci u organizmu, a jedan od takvih je P-glikoprotein (P-gp), polipeptid sa 1280 amino-kiselina, klinički značajan transmembranski transporter kod ljudi, koji je član ATP vezujućeg kaskadnog (ABC) transportnog sistema. Ovaj glikozilirani membranski protein od 170 kDa prvi put je izolovan 1976, kod hrčaka koji su bili otporni na kolhicin (120). Protein se sastoji od dve polovine, od kojih svaka sadrži šest hidrofobnih transmembranskih delova i ATP vezujući deo. Dve polovine su odvojene fleksibilnim povezujućim regionom dok su dva ATP-vezujuća domena strukturno slična. Svih 12 transmembranskih domena su delovi plazma membrane (121). P-gp se nalazi u apikalnom delu ćelijske membrane ćelija sa ekskretornim funkcijama (jetra, bubrezi, tanko crevo, želudac i krvno-moždana barijera) (122,123). Fiziološka ekspresija P-gp u tkivima je važna determinanta za detoksikaciju u različitim ćelijama i tkivima (124-127). Ovaj protein takođe posreduje u blokiranju hidrofobnih ksenobiotika preko placente i sprečavanju prolaska supstanci

u CNS putem krvno-moždane barijere (123). Nedavno je dokazano da se P-gp nalazi unutar ćelija sa lizozomima, utičući na lizozomsku sekvestraciju ksenobiotika (128).

P-gp je kodiran MDR1 (Multi Drug Resistance-1) genom, koji se nalazi na sedmom hromozomu i sastoji se od 28 egzona veličine od 49 do 209 baznih parova. Polimorfizam MDR1 gena su prvi opisali Hoffmeier i saradnici, koji su uočili korelaciju između niže crevne ekspresije P-gp i polimorfizma u egzonu 26 MDR-1 gena (129). U početku je detektovano samo 15 različitih SNP-ova u egzonima MDR-1 (ABCB1) gena, dok je kasnije opisano najmanje 50 SNP-ova uzrokovanih insercijom ili delecijom (130,131). Većina ovih SNP-ova su tihi (silent) polimorfizmi, i ne uzrokuju promenu u sekvencama amino kiselina P-gp. Studije različitih etničkih grupa su pokazale da se polimorfizmi MDR1 gena, označeni kao 1236>T, 2677G>T/A/C i 3435C>T najčešće prisutni u genomu ispitanika. Literaturni podaci ukazuju na činjenicu da je SNP C3435T, koji se nalazi u egzonu 26 MDR1 gena, povezan sa nivoima P-gp i sposobnošću preuzimanja supstrata (129).

Naime, pojedinci koje su homozigoti za T-alel imaju značajno smanjen nivo ekspresije P-gp u poređenju sa homozigotima za C-alel. ABCB1 sinonimni SNP-a 1236> T i 3435> T su povezani sa nesinonimima SNP (2677G>T, Ala893Ser) (6) i javljaju se u varijabilnim, ali sličnim frekvencama u evropskim populacijama, dok je njihovo prisustvo statistički značajno različito u etničkim grupama afričkog i azijskog porekla(132).

Genetske varijante MDR1 mogu uticati na interindividualnu varijabilnost u bioraspoloživosti i farmakokinetici raznih lekova (128,133). Neka istraživanja su pokazala da 3435C>T je bio povezan sa značajno smanjenom intestinalnom P-gp ekspresijom kod homozigota T/T u poređenju sa subjektima homozigotima za C alel (C /C), što je dovelo do veće koncentracije digoksina u plazmi posle oralne primene (133,134). Međutim, veliki broj studija na ljudima je pokazalo inkonzistentnost, čak i kada su ispitivani isti lekovi, iste bolesti ili etničke grupe (134,135).

MDR1 u HOBP

Parenhim pluća i traheobronhijalni epitel imaju barijernu ulogu prema spoljnoj sredini. Oni poseduju visoku transkripcionu aktivnost za veliki broj ABC transportnih sistema (136,137). U ljudskim plućima, P-gp se nalazi na apikalnoj strani cilijarnih epitelnih ćelija ili cilijarnih kanala, kao i na apikalnoj i bočnim površinama seroznih ćelija bronhijalnih žlezda, ali ne u peharastim ćelijama koje proizvode sluz (138). Bojenje na P-gp protein u epitelnim ćelijama traheje i glavnih bronhija je izraženo, dok je bojenje manjih bronhija smanjeno ili odsutno. P-gp je takođe pronađen u lateralnim membranama nazalne respiratorne mukoze (139). Neka istraživanja nisu utvrdila bojenje pneumocita na P-gp (140). Antitelima je dokazano prisustvo P-gp u endotelnim ćelijama krvnih sudova. Bojenjem je dokazano prisustvo u alveolarnim i monocitima/makrofazima iz krvi ali je koncentracija P-gp bila varijabilna (138). Apikalna lokalizacija u epitelu može značiti da je P-gp važan za transport jedinjenja iz intersticijuma u lumen, iako precizna funkcija P-gp u plućima ostaje nepoznata.

Rezultati jedne studije sugerišu da P-gp protein ima ulogu u borbi protiv toksičnog dejstva pušenja i uklanjanja metabolita oksidativnog stresa (141). MDR1 takođe ima ulogu u ćelijskoj regeneraciji (142). Neki autori su otkrili smanjenu ekspresiju i aktivnost P-gp tokom inflamacije (143). U studiji koju je sproveo van der Deen i saradnici, pokazano je da MDR protein ima

snažno antioksidativno djelovanje. Utvrđeno je da su pacijenti sa HOBP imali smanjen nivo MDR proteina u njihovom bronhijalnom epitelu (144). U studiji Dogana i saradnika, četrdeset jedan učesnik sa HOBP genetski je tipizovan na MDR1 3435C/T polimorfizam (145). U poređenju sa kontrolnom grupom, pacijenti sa HOBP su bili značajno češće homozigoti i heterozigoti za MDR1 C3435T35 polimorfizam. T – alel frekvenca je bila značajno veća kod pacijenata sa HOBP (52%) u poređenju sa učesnicima kontrolne grupe (19%) (145). Ovi nalazi sugerišu da MDR1 može igrati ulogu u razvoju HOBP kroz modulaciju inflamatornog odgovora i zbog poremećaja detoksikacionih mehanizama.

2.2.2.CYP3A5

CYP3A5 je jedan od enzima monooksigenaznog sistema citohroma P450. Podporodica CYP3A, kod čoveka obuhvata CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 i CYP3A43 i jedan od najnaprednijih sistema biotransformacije, koja olakšava eliminaciju lekova i drugih ksenobiotskih jedinjenja iz organizma (146). CYP3A5 je smešten na hromozomu 7q 21.1 i eksprimira se kao 52.5 –kDa protein, koji se sastoji od 502 aminokiseline. On je po svojoj strukturi i funkciji veoma sličan CYP3A4, tačnije 85% njegove sekvence je slično CYP3A4 (147). Analizom enzimske aktivnosti utvrđeno je da CYP3A5 i CYP3A4 imaju preklapajuću specifičnost supstrata (148), ali aktivnost CYP3A5 pokazuje velike interindividualne varijacije. Interesantno je da mnoge osobe nemaju funkcionalnu verziju ovog enzima, tako da je enzim u svojoj funkcionalnoj varijanti prisutan kod većine Afroamerikanaca (45-73%) a u značajno manjem procentu kod osoba bele rase (5-15%) (139,149). Kod onih ljudi koji imaju funkcionalni enzim, on može predstavljati preko 50% od ukupne aktivnosti CYP3A, doprinoseći CYP3A metabolizmu. Ovaj enzim se nalazi u različitim tkivima, naročito jetri, bubrezima i plućima (150,151,152).

Supstrati ovog enzima su mnogobrojni lekovi, poput nekih antihipertenziva, imunosupresivnih lekova, statina i drugih (152,154,155,156). Jedna od najznačajnijih uloga ovoga enzima je da može delovati kao supresor tumora, naročito kod hepatocelularnog karcinoma (157). Takođe su određene studije ukazale da nefunkcionalna varijanta CYP3A5 povećava rizik od razvoja akutne i hronične leukemije, ističući značaj efekta faze 1 detoksikacije u borbi protiv kancera (158).

CYP3A5 polimorfizam

Postoji preko 25 varijanti ovog enzima, međutim mnogi od njih nisu funkcionalni. Potpuno funkcionalna varijanta je poznata kao CYP3A5*1 (A6986-wild type). Frekvencija funkcionalne forme se značajno razlikuje među etničkim grupama. Funkcionalni enzim je nađen kod 45-73% ispitanika Afričkog porekla i 5-15% osoba bele rase (148,149). Oni koji imaju CYP3A5*1 bolje metabolišu neke CYP3A supstrate nego ljudi koji nemaju ovu varijantu enzima. Takođe treba napomenuti da ljudi sa funkcionalnom varijantom CYP3A5 mogu biti osetljiviji na so (so-senzitivna hipertenzija), odnosno imaju veću sposobnost reasorpcije natrijuma u bubrezima koja je povezana sa starenjem. Nešto više od 70% Afroamerikanaca su CYP3A5 ekspresori, odnosno poseduju aktivnu varijantu navedenog enzima-CYP3A5*1 jer su nosioci jednog ili dva CYP3A5*1 alela.

Najčešća i funkcionalno važna SNP u CYP3A5 genu, se javlja kada dodje do tranzicije A6986G u intronu 3 (sl.4) (159).Ova mutacija stvara alternativnu vezu u pre mRNK i proizvodnju aberantne mRNK koja sadrži 131 bp (egzon 3B) umetnut između egzona 3 i egzona 4 (sl 5). Ovo dešavanje dovodi do takozvanog “splajsing efekta”, odnosno defekta u spajanju, te stvaranju nefunkcionalne forme enzima CYP3A5*3(149). Njegova alelna frekventnost varira od 50% kod Afroamerikanaca do 90% kod belaca (149). Naime, postojanje ove varijante povećava rizik od akutne i hronične leukemije, kolorektalnog karcinoma, naročito među azijskom i populacijom na Kavkazu (159). Treba napomenuti da se kod onih osoba koji imaju ovu formu enzima često koristi termin neekspresori CYP3A5. Značaj CYP3A5*3 alela je prvo postao očigledan zbog efekta na metabolizam takrolimusa. Neka istraživanja su pokazala da pojedinci sa CYP3A5*3 /*3 pokazuju značajno veće koncentracije korigovane doze u serumu. Interesantna su i zapažanja nekih studija da deca koja koriste inhalacionu terapiju beklometazonom koja imaju ovu varijantu enzima imaju bolju kontrolu astme (160).

CYP3A5 u hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća

Iako je pušenje cigareta dobro poznat faktor rizika za nastanak HOBP, ne razvijaju svi pušači HOBP. Izgleda da su neke osobe osetljivije na štetne hemikalije iz duvanskog dima u odnosu na druge, najverovatnije usled genetskih varijacija. Genetski faktori igraju bitnu ulogu u upali disajnih puteva i padu plućne funkcije (161,162), kao nezavisni faktori rizika (npr deficijencija

alfa 1 antitripsina) ili u kombinaciji sa faktorima iz okruženja (163,164,165). Duvanski dim sadrži policiklične, aromatične ugljovodonike (PAHs), koji kada dospeju u organizam budu aktivirani putem sistema enzima citohroma P450 (166,167). Aktivirani PAHs su povezani sa smanjenom funkcijom pluća (168). Mnoge studije su dokazale vezu između genskog polimorfizma CYP1A1, CYP2A6, CYP2E1 i HOBP i/ili emfizema (169,170,171).

CYP3A5 igra glavnu ulogu u oksidativnim reakcijama biotransformacije egzogenih kancerogena, uključujući duvanski dim, i endogenih supstrata, kao što su steroidi, kao i metabolizam 50-60% lekova koji se trenutno koriste (172,173). Zhang i sar. (174) su prikazali da je CYP3A5 jedan od glavnih izoformi CYP-a koje su izražene u ljudskim plućima. Nekoliko studija pokazalo je da je glavni plućni CYP3A oblik u ljudskim plućima CYP3A5, dok je CYP3A4 izražen u oko 20% pojedinaca, koristeći gen specifični PCR i / ili antitela specifična za izoformu (175,176,177). U plućima, CYP3A5 se delimično ekspirira u odnosu na CYP3A4, sa najvećim procentom u bronhiolama i alveolranim epitelnim ćelijama, bronhijalnim žlijezdama i alveolaranim makrofazima (178,179,180). Uobičajna A>G mutacija u intronu 3 od CYP3A5 gena (CYP3A5*3) daje nisku ekspresiju proteina CYP3A5 u jetri kao rezultat nepravilnog mRNK spajanja i smanjene translacije funkcionalnog proteina (173,178). Kod osoba bele rase, CYP3A5 *3 alelna frekvencija je 80-95%, dok su frekvencije drugih polimorfizama CYP3A5 su izuzetno niske (<1,0%) (173,178). Iako studije *in vitro* koriste ljudsku jetru i creva pokazali su da CYP3A5*3/*3 genotip ekspresije niže ili beznačajne nivoe mRNA CYP3A5 i proteina u poređenju sa genotipom CYP3A5*1/*1 (180,181), efekat ovog polimorfizma na ekspresiju CYP3A5 u ljudskim plućima nije poznat. Zanimljivo je da je mRNA CYP3A5 i/ili protein pronađen je u bronhijalnoj sluzokoži i/ili perifernim tkivima pluća u 90% ili više ispitanih pojedinaca (177,182), što je više od učestalosti individua sa visokim nivom ekspresije CYP3A5 u jetri.

U radu Takayukija i saradnika (161) dokazana je povezanost između CYP3A5 genotipova i statusa pušenja na funkciju pluća. Godišnja stopa pada FEV1 i FVC kod pušača bila je veća među CYP3A5*1/*3 nosiocima nego kod CYP3A5*3/*3 nosioca, dok incidencije hroničnog kašlja i HOBP kod trenutnih pušača su takođe bile veće u CYP3A5*1/*3 genotipu nego kod nepušača ili trenutnih pušači sa genotipom CYP3A5*3/*3 (161).

2.2.3. Faktor nekroze tumora alfa (TNF-alfa)

Faktor nekroze tumora - alfa (engl. Tumor Necrosis Factor – alpha, TNF- α) je proinflamatorni citokin koji pripada TNF superporodici citokina. Primarna uloga TNF- α je regulacija imunskih ćelija, međutim ovaj citokin može da indukuje apoptozu, inflamaciju, da inhibira tumorogenezu i viralnu replikaciju. (183,184,185) Poremećaj regulacije stvaranja TNF može biti značajan za patogenezu nekih bolesti i tumora kod čoveka (183,186,187).

TNF- α je protein sastavljen od 233 aminokiseline i vezan je za ćelijsku membranu (membranska forma TNF- α , mTNF- α). Njegova molekulska masa je 26 kDa. Pored njega postoji i solubilna forma TNF- α (sTNF- α), koja nastaje aktivnošću TNF- α konvertujućeg enzima (engl. TNF- α Converting Enzyme, TACE) (188). sTNF se sastoji od 157 aminokiselina, molekulske mase 17kDa. Navedene forme TNF- α mogu postojati kao mono, di i trimerni proteini, ali su aktivni isključivo u trimernom obliku (189).

Faktor nekroze tumora – α ostvaruje svoje biološke efekte u organizmu tako što se vezuje za dva tipa receptora i time dovodi do aktivacije signalnih puteva. Naime, TNF- α se veže za odgovarajuće receptore, a to su: TNF-R1 (TNF receptor tip 1; CD 120a p55/60) i TNF-R2 (TNF receptor tip 2; CD 120b p75/80). Vezivanje TNF- α za TNFR1 dovodi do konformacionih promena samog receptora, kada dolazi do disocijacije, odnosno odvajanja inhibitorynog proteina (koji je poznat kao “sajlenser” domena smrti – engl. Silencer of Death Domain, SODD) sa intracelularnog domena. Na ovaj način (nakon uklanjanja SODD), t.j. nakon disocijacije daje se mogućnost da se TNF-R1 veže za DD vezan za TNFR1 (engl. TNFR1-Associated Death Domain Protein, TRADD), (190,191) a ovim se opet stvara mogućnost za dodatno proteinsko vezivanje. Naime, dolazi do vezivanja proteina sa DD, koji se pridružuje Fas receptoru i nastaje Fas Associated Death Domain, FADD, ili TNF receptoru pridruženog faktora 2 (engl. TNF Receptor – Associated Factor 2, TRAF2) i receptor interreagujućeg proteina 1 (engl. Receptor-Interacting Protein 1, RIP1) (191).

Nakon vezivanja TRADD za TNFR1 mogu biti aktivirana tri signalna puta, a to su: aktivacija NF- κ B, zatim aktivacija MAPK puta i indukcija apoptoze (192,193).

Aktivacija NF- κ B (nuklearni faktor kapa B) se dešava na sledeći način: TRADD regrutuje TRAF2 i RIP1 koji pokreću celu signalnu kaskadu koja pomoću transformišućeg faktora rasta β aktivira aktiviranu kinazu 1 (engl.TGF- β 1, TAK1), i I κ B kinazni kompleks (engl. I κ B kinase, IKK), inhibitor NF- κ B (engl. Inhibitor of NF- κ B α , I κ B α). Na taj način dolazi do aktivacije NF- κ B koji je heterodimerni transkripcioni faktor koji se translocira u nukleus i posreduje transkripciju velikog broja proteina koji imaju udela u ćelijskom preživljavanju i proliferaciji (inibicija apoptoze, indukcijom mnogih gena), inflamatornom odgovoru (IL-6, IL-8, hemokini) ali i apoptoznih faktora (194,195).

Aktivacija MAPK puta (engl.Mitogen- Activated Protein Kinaze,MAPK): Od tri glavne MAPK kaskade, TNF indukuje jaku aktivaciju stres vezane JNK (Jun-N-terminalne kinaze) grupe i evocira umereni p38 –MAPK odgovor. Aktivacija JNK grupe se odvija tako što TRAF2 i RIP1 aktiviraju JNK-indukujuće kinaze: MAP/ERK (engl.Extracellular Signal Regulated Kinaze,ERK) kinaze kinazu 1 (MEKK1), MAP kinaze kinazu 7 (MKK7) i JNK. Ovaj JNK signalni put učestvuje u ćelijskoj diferencijaciji, proliferaciji i generalno gledano je proapoptozan. Treba istaći da se apoptoza pokreće aktivacijom JNK samo onda kada izostane aktivacija NF- κ B (195,196).

Indukcija apoptoze

TNF-R1 učestvuje u signalizaciji ćelijske smrti na taj način što vezivanje TRADD za TNFR1 dovodi do intracelularnog signala kada se FADD vezuje za TRADD, te dolazi do aktivacije kaspaze 8 i kaspaze 3 i ćelijske apoptoze. Trebalo bi istaći da TNF- α indukovana smrt ćelija igra samo manju ulogu u poređenju sa njegovim sveobuhvatnim funkcijama u inflamatornom procesu. Njegov smrt-indukujući kapacitet je vrlo slab u poređenju sa drugim članovima superporodice (Fas) i često je prikriven NF- κ B antiapoptoznim efektima. Ipak, TRADD vezuje FADD koji se onda regrutuje u cistein proteazu te se aktivira kaspaza 8 (196). Visoka koncentracija aktivirane kaspaze 8 indukuje njegovu autoprotelitičku aktivaciju i naknadno cijepanje efektorskih kaspaza, što u daljem toku dovodi do ćelijske apoptoze.

Istraživanja su pokazala da TRAF2 ima veći afinitet za TRADD nego za TNFR1 i TNFR2, tako da je sada razumljivija činjenica da je TNF- α jači aktivator TNFR1 , koji koristi TRADD kao adapter, nego TNFR2 , koji sa njim ne reaguje (197).

Polimorfizam gena za TNF-alfa

Humani gen za TNF- α je smešten na kratkom kraku šestog hromozoma u MHC regionu, između lokusa HLA-B I klase i HLA-DR II klase. Gen za TNF- α je veličine oko 3 kb, a sastoji se od 4 egzona i 3 introna (198). Gen za TNF- α je lokalizovan u veoma polimorfnom regionu, tako da je i u samom TNF lokusu identifikovan veliki broj polimorfizama (T-1031C, C-863A, C-857A, C-851T, G-419C, G-376A, G-308A, G-238A, G-162A i G-49A). Polimorfizam rs1800629 (TNF- α G -308A) nalazi se u promotoru gena za TNF- α . Ovaj polimorfizam se karakteriše postojanjem dve alelne forme: jedne koja ima guanin (G) kao češći alel i druge gde je guanin (G) u položaju -308 zamenjen adeninom (A) koji predstavlja ređi alel. Prisustvo ređeg TNF- α A alela se može dovesti u vezu sa povećanom spontanom ili stimulisanom sekrecijom TNF- α *in vivo* i *in vitro* uslovima (199). A alel može dovesti do povećanog afiniteta za vezivanje nuklearnih faktora za TNF- α promotor, što za posledicu ima viši nivo transkripcije te povećanu sekreciju TNF- α (200). Isto tako se rs1800629 polimorfizam dovodi u vezu sa izraženim inflamatornim odgovorom na različite oksidativne agense (84). Budući da sam rs1800629 utiče na sintezu citokina, njegovo prisustvo se može povezati sa brojnim bolestima (199-204).

TNF- α u hroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća

TNF- α je plejotropni citokin, koji primarno proizvode aktivirani makrofagi (5,6). TNF- α igra veoma značajnu ulogu u mnogim inflamatornim bolestima pluća, kao što su: hronični bronhitis (CB), HOBP, bronhijalna astma, akutno plućno oštećenje (engl. Acute Lung Injury, ALI) i akutni respiratorni distress sindrom (ARDS) (194,195).

Kod bolesnika sa HOBP, najvažniji faktor koji dovodi do oštećenja pluća je dugotrajno izlaganje duvanskom dimu, što izaziva inflamaciju disajnih puteva, koju karakteriše neutrofilna i makrofagna infiltracija, i prisustvo aktiviranih T-limfocita, kao i povećana koncentracija citokina kao što su TNF- α , IL-6 i IL-8 (205). Smatra se da je upravo dim cigareta glavni aktivator makrofaga koji potom proizvode TNF- α . Nekoliko studija je upravo to i potvrdilo na taj način što su pokazale značajno povećane nivoe TNF- α , IL-6 i IL-8, zajedno sa neutrofilima, makrofagima i T-limfocitima u perifernoj krvi pacijenata sa HOBP koji su pušači (196). Visoki nivoi TNF- α su detektovani u indukovanom sputumu, ali i prilikom biopsije pluća HOBP pacijenata (206,207,208). Takođe je u brojnim, različitim studijama pronađen visok nivo TNF- α

u serumu bolesnika sa HOBP, koji korelira sa stepenom ograničenja protoka vazduha kroz disajne puteve (6,196,209-213). TNF- α je povećan i u bronhoalvelarnom lavatu (BAL) obolelih od HOBP. Naime, kod blage i umerene forme HOBP verifikovane su značajno veće vrednosti ovog citokina u BAL u odnosu na kontrolnu grupu zdravih osoba (5). Povećani nivoi IL-6,IL-8 i TNF- α se mogu koristiti kao biomarkeri sistemskog inflamatornog odgovora kod obolelih od HOBP, a njihovi nivoi su u korelaciji sa stepenom težine HOBP (5), što se poklapa sa studijom Mathanraja i saradnika (193). Poznato je da TNF- α predstavlja snažan medijator koji regrutuje neutrofile kod pacijenata sa HOBP, tako da su u ovoj populaciji značajno viši nivoi neutrofila i TNF- α u sputumu u odnosu na zdravu, kontrolnu grupu (214). Takođe u sputumu teških HOBP, pušača sa subkliničkim emfizemom pronađen je veći broj regrutovanih neutrofila (215,216).

Do nastanka emfizema i HOBP dovodi poremećaj ravnoteže između proteaza i antiproteaza (217). Razvoj emfizema može nastati usled destrukcije zida alveola, koje nastaje je kao posledica apoptoze (218). Istraživanja na transgenim miševima kojima je data parenteralno aktivna kaspaza-3 dovela je do razvijanja emfizematoznih promena na plućima (219), čime se pružio direktan dokaz da je apoptoza alveolarnog zida dovoljna da može dovesti do plućnog emfizema, čak i bez akumulacije inflamatornih ćelija. Shodno tome apoptoza igra verovatno vrlo značajnu ulogu u patogenezi HOBP (220). TNF- α indukuje ekspresiju enzima matriks metaloproteinaza (grupa enzima odgovorna za destrukciju ekstraćelijskog matriksa, engl. Matrix Metallproteinases, MMP) koji su uključeni u patogenezu HOBP. Ova aktivacija indukuje NF- κ B (221, 222), tako da je moguće da i aktivacija NF- κ B kroz TNFR2 delimično doprinosi razvoju HOBP. Svakako značajna konstitutivna ekspresija TNF- α verovatno remeti regulatorne procese reparacije u plućima, odnosno regulaciju proteaza, o čemu je bilo više reči u studiji sa TNF- α -null miševima (223), koji su pokazali značajnu redukciju inflamacije i smanjenje povećanja volumena pluća u odgovoru na šestomesečno izlaganje dimu cigareta, što ukazuje na značaj TNF- α u patogenezi HOBP (223,224,225).

3. CILJ RADA

Važnu ulogu u nastanku HOBP igraju faktori sredine i pušenje, ali u interakciji sa individualnom naslednom predispozicijom za nastanak bolesti, zbog čega je HOBP svrstana u grupu multifaktorijalnih bolesti. Ipak, tačna uloga naslednih faktora do danas nije rasvetljena, a neka istraživanja ukazuju na patogenetski značaj enzima koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika, ne samo za nastanak bolesti, već i za njen klinički tok i odgovor na terapijske mere. Imajući napred pomenuto u vidu, a s obzirom da se radi o veoma čestom i značajnom zdravstvenom problemu, ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Utvrđivanje učestalosti genskih polimorfizama MDR-1 C3435T, CYP3A5*3 (rs776746) i TNF-alfa kod osoba obolelih od HOBP i zdravih ispitanika;
2. Utvrđivanje postojanja razlike u distribuciji analiziranih polimorfizama između bolesnika sa HOBP i zdravih osoba;
3. Utvrđivanje postojanja razlike u distribuciji analiziranih polimorfizama između polova;
4. Korelacija prisustva genskih polimorfizama ispitivanih gena sa prisustvom faktora rizika (pušenje);
5. Korelacija prisustva genskih polimorfizama ispitivanih gena sa stepenom težine bolesti bolesnika sa HOBP;
6. Korelacija prisustva genskih polimorfizama ispitivanih gena sa prisustvom komorbiditeta obolelih od HOBP;

4. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je sprovedeno kao prospektivna studija koja je obuhvatila 92 osobe (64 muškaraca i 26 žena) obolele od HOBP, koji su ambulantno i bolnički lečene, i 158 zdravih osoba (113 muškarca, 45 žena) koji su činili kontrolnu grupu.

Svi ispitanici su pre uključivanja u istraživanje bili informisani o ciljevima i dizajnu istraživanja. Istraživanje je odobreno od strane etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i sprovedeno u skladu sa Helsinškom deklaracijom i smernicama dobre kliničke prakse.

Istraživanje je sprovedeno u sledećim ustanovama, tj. njihovim organizacionim jedinicama:

1. Klinici za plućne bolesti u Kliničkog centra u Nišu
2. Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

4.1. Ispitanici

U istraživanje su uključena 92 bolesnika sa HOBP (64 muškarca i 26 žena) koji su formirali kliničku grupu i 158 zdravih osoba (113 muškaraca, 45 žena) koji su činili kontrolnu grupu.

4.1.1. Kontrolna grupa

U svrhu određivanja frekvence genotipa i alela gena čiji su polimorfizmi bili cilj ovog istraživanja, formirana je kontrolna grupa koja je obuhvatila 158 zdravih osoba (113 muškaraca, 45 žena) – dobrovoljnih davalaca krvi, koji su genotipizirani na prisustvo polimorfizama MDR1 C3435T, CYP3A5*3 i G-308A TNF- α , radi poredjenja sa kliničkom grupom. Osobe koje su formirale kontrolnu grupu pre uključivanja u studiju dale su pisani pristanak i informisane su o istraživanju, nakon čega su popunile upitnik i isključeno je prisustvo oboljenja relevantnih za ovo istraživanje, nakon čega je uzet uzorak krvi i izvršena genotipizacija.

4.1.2. Klinička grupa

U istraživanje su uključeni bolesnici sa HOBP lečeni ambulantno i bolnički na Klinici za plućne bolesti u Kliničkom Centru u Nišu.

Kriterijumi za uključivanje bolesnika u istraživanje:

1. Verifikovana HOBP prema GOLD smernicama
2. Pacijenti koji nisu imali dekompenzovanu kardiomiopatiju
3. Pacijenti koji u protekle 4 nedelje nisu imali akutni infarkt miokarda
4. Potpisani pristanak o učestvovanju u istraživanju i dobrovoljnom davanju uzorka pune krvi radi ispitavanja MDR1, TNF-alfa i CYP3A5.

4.1.2.1. Protokol istraživanja

Protokol istraživanja je podrazumevao:

- a) Spirometrijski pregled ispitanika
- b) Prikupljanje podataka ispitanika o njihovom zdravstvenom stanju primenom zvaničnih upitnika za procenu dispneje t.j. mMRC-dispneja skale i upitnika za procenu ostalih simptoma pacijenata obolelih od HOBP t.j. CAT.
- c) Prikupljanje podataka o ispitanicima analizom medicinske dokumentacije i anamnezom.
- d) Uzimanje uzoraka krvi ispitanika i odvajanje DNK, plazme i eritrocita radi izvođenja genetskih i biohemijskih analiza.

4.1.2.2. Metode spirometrije i anketiranja

Pacijenti koji su uključeni u istraživanje su imali odnos forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (FEV1) sa forsiranim vitalnim kapacitetom (FVC) FEV1/FVC manji od 70% postbronhodilatatorno. Njihova dijagnoza HOBP je strogo postavljena na osnovu kriterijuma iz GOLD smernica. Ispitivani su sledeći parametri: FEV1, FVC, mMRC-dispneja skala, CAT, KKS, CRP . Svi bolesnici su bili podvgnuti detaljnom kliničkom i laboratorijskom ispitivanju kada su verifikovane egzacerbacije i postojanje komorbiditeta.

U toku ovog istraživanja rađene su sledeće analize kod pacijenata:

- Demografske karakteristike bolesnika (starost, pol, pušačka navika)
- Anamnestički podaci o trajanju bolesti
- Anamnestički podaci o pogoršanjima bolesti
- Sagledavanje medicinske dokumentacije ispitanika
- Ispitivanje plućne funkcije spirometrijom-postbronhodilatatorni FEV1 i FVC su mereni na spirometrijskom aparatu Erich Jaeger Masterlab Germany.
- Samostalno ispunjavanje **mMRC- dispnea skale** od strane pacijenta (uz predhodno objašnjenje od strane nadležnog lekara). Ova skala se sastoji od sledećih ponuđenih odgovora na osnovu kojih se gradira stepen težine dispneje:

Gradus 0- nema dispneje osim pri intenzivnom fizičkom naporu

Gradus 1-nedostatak daha pri hodanju po blagom usponu ili pri brzom hodu

Gradus 2-sporije hoda nego obično zbog nedostatka daha, a ako hoda svojim ritmom mora da se zaustavi

Gradus 3-zastaje na svakih 100 metara zbog nedostatka vazduha

Gradus 4-zbog nedostatka vazduha ne napušta kuću/ nedostatak daha pri svlačenju i oblačenju.

- Samostalno ispunjavanje **upitnika za procenu HOBP-CAT** od strane pacijenta (uz predhodno objašnjenje od strane nadležnog lekara). Navedeni upitnik se sastoji od osam stavki koje u sebi sadrže neke od karakteristika koje se javljaju kod HOBP, a to su u prvom redu kašalj, prisustvo šlajma u grudima, osećaj stezanja u grudima, gubitak daha prilikom kretanja po uzbrdici ili stepenicama, zatim da li ima poteškoće prilikom obavljanja kućnih aktivnosti, da li se oseća sigurno kada izađe kuće, da li može da spava noću i koliko snage ima. Ove stavke se boduju od 0 do 5, a pacijent krstićem obeležava broj kojim opisuje prisustvo nekog od navedenih simptoma. Nakon toga se broj poena sabira i dobija se konačni rezultat koji može biti u opsegu od 0-40. Upitnik za procenu težine simptoma je razumljiv i u potpunosti prilagođen našem jeziku, te ga pacijenti uz predhodno objašnjenje od strane nadležnog lekara veoma dobro razumeju.

Navedeni test skor – CAT u originalnoj verziji (na engleskom jeziku) je prikazan na sledećoj strani.

Your name:

Today's date:



How Is your COPD? Take the COPD Assessment Test™ (CAT)

This questionnaire will help you and your healthcare professional measure the impact COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) is having on your wellbeing and daily life. Your answers, and test score, can be used by you and your healthcare professional to help improve the management of your COPD and get the greatest benefit from treatment.

For each item below, place a mark (X) in the box that best describes you currently. Be sure to only select one response for each question.

Example: I am very happy 0 1 2 3 4 5 I am very sad

			SCORE
I never cough	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I cough all the time	<input type="text"/>
I have no phlegm (mucus) in my chest at all	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	My chest is completely full of phlegm (mucus)	<input type="text"/>
My chest does not feel tight at all	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	My chest feels very tight	<input type="text"/>
When I walk up a hill or one flight of stairs I am not breathless	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	When I walk up a hill or one flight of stairs I am very breathless	<input type="text"/>
I am not limited doing any activities at home	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I am very limited doing activities at home	<input type="text"/>
I am confident leaving my home despite my lung condition	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I am not at all confident leaving my home because of my lung condition	<input type="text"/>
I sleep soundly	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I don't sleep soundly because of my lung condition	<input type="text"/>
I have lots of energy	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I have no energy at all	<input type="text"/>
			TOTAL SCORE <input type="text"/>

COPD Assessment Test and the CAT logo is a trade mark of the GlaxoSmithKline group of companies.
 © 2009 GlaxoSmithKline group of companies. All rights reserved.
 Last Updated: February 24, 2012

-Analiza podataka o komorbiditetima, isključivo na osnovu dostupne medicinske dokumentacije sa preciznim dijagnozama.

-BMI-Indeks telesne mase (Body Mass Index) je visinsko-težinski pokazatelj uhranjenosti pojedinca i validan je za sve osobe starije od 20 godina. Računa se tako što se telesna masa osobe u kilogramima podeli sa kvadratom visine u metrima po sledećoj formuli:

$BMI = \text{masa (kg)} / \text{visina na kvadrat (m)}$

BMI ne uzima u obzir telesnu građu, te je njegova upotreba ograničena, ali s obzirom da su telesna masa i visina ispitivanih pacijenata rutinski unošene u medicinsku dokumentaciju tokom funkcionalne dijagnostike, bilo je vrlo praktično da se njima koristimo za procenu uhranjenosti. Kao meru za klasifikaciju BMI, odnosno procenu uhranjenosti koristili smo Klasifikaciju BMI koju je prihvatila Svetska zdravstvena organizacija i međunarodno udruženje za procenu gojaznosti. Navedena klasifikacija pacijente sa BMI manjim od 18,5 svrstava u pothranjene ili neuhranjene, zatim one sa BMI od 18,5-24,9 stavlja u grupu normalne ili idealne telesne mase, potom BMI 25-29,9 predstavljaju pacijenti sa prekomernom telesnom masom, zatim oni sa BMI 30-34,9 imaju blagu gojaznost, dok osobe sa BMI 35-39,9 imaju tešku gojaznost, a BMI preko 40 predstavlja ekstremnu gojaznost. Ova klasifikacija ipak varira u odnosu na pojedinačne države koje su u skladu sa svojim određenim kriterijumima napravile svoje sopstvene klasifikacije. Naime, BMI ne može ilustrovati procenat masnog tkiva u odnosu na mišićnu ili koštanu masu - što je osnovni kriterijum za procenu uhranjenosti. Pojedinci sa velikom telesnom masom i visokim BMI se ne mogu automatski kategorizovati kao gojazni. Npr kod krupno građenih ljudi - sportista udeo mišićne i koštane mase u odnosu na visinu je velik, ali to ne znači da su oni debeli. Ipak, bez obzira na nedostatke, BMI se koristi kao dobra medicinska i statistička mera uhranjenosti, koju smo uzeli za validnu u našoj studiji.

-Podaci o broju egzacerbacija u toku proteklih godinu dana. Ove podatke smo dobili iz dostupne medicinske dokumentacije, ali i anamnestički, koji su sami pacijenti prijavili, a za koje nismo imali sasvim jasnu dokumentacijsku potvrdu jer su lečeni u kućnim uslovima ili ambulantno. Naime, rukovodili smo se postojećom subklasifikacijom težine egzacerbacija prema resursima zdravstvene zaštite na blage -lečene u kućnim uslovima, umerene koje zahtevaju medicinsku

pomoć, ali se mogu tretirati kući ili ambulantno i teške koje zahtevaju hospitalno lečenje. Laboratorijska analiza krvi (KKS, odnos broja neutrofila i limfocita, CRP, parametri acidobaznog statusa)

4.2. Metode

Analiza uzoraka DNK je vršena u Naučnoistraživačkom centru za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu. Uzorci krvi za izolaciju DNK i analizu genskih polimorfizama PCR metodom uzeti su od svih ispitanika kontrolne i kliničke grupe, nakon što su upoznati sa protokolom istraživanja i dali svoj pismeni pristanak. Za analizu je korišćen uzorak pune venske krvi 3-4 ml sa Etilen diamin tetra sirćetnom kiselinom (Etilen Diamin Tetra Acetic Acid, EDTA), dobijen punkcijom kubitalne vene.

4.2.1. Izolacija DNK iz uzoraka pune krvi

DNK je izolovana iz 200µl pune krvi korišćenjem QIAamp DNA Mini kit-a (QIAGEN Inc USA) prema protokolu proizvođača. Nakon dodavanja 20µl QIAGEN protease (ili proteinaze K) u tubicu od 1,5 ml, dodaje se 200µl uzorka i 200µl AL pufera. Smeša se inkubira 10 minuta na 56°C . Zatim se doda 200µl etanola i sve prebaci u QIAamp Mini spin kolonu i centrifugira 1 minut na 8000 obrtaja. Kolone se prebace u čiste kolekcione tubice i doda 500µl AW1 pufera , pa se ponovo centrifugira na isti način. Postupak se ponovi ali se sada doda 500µl AW2 pufera i centrifugira 3 minuta na najvećoj brzini centrifuge. Koloni se na kraju doda 70µl AE pufera, inkubira 1 minut i centrifugira minut na 8000 obrtaja.

Nakon izolacije merena su prečišćenost i koncentracije DNK pomoću nanodropa Shimadzu BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Kjoto, Japan). DNK prinos od 20-100 ng/µL i prečišćenost od 1,8 - 2.0 (OD260/280) smatrani su pogodnim za analizu ispitivanih polimorfizama. DNK koja je ispunjavala determinisane parametre koncentracije i prečišćenosti čuvala se na temperaturi od -20°C do početka eksperimenta.

Genotipizacija polimorfizma TNF- α gena rs1800629 PCR-RFLP metodom

Polimorfizam TNF- α gena - rs1800629 (G-308A) detektovan je metodom PCR-RFLP. Prvi korak je bio amplifikacija željenih segmenata DNK metodom lančane reakcije polimerizacije (PCR). Sekvence korišćenih prajmera za ispitivanje polimorfizma rs1800629 date

su u Tabeli 3. Za PCR reakciju korišćen je HotFirePol® GC Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonija), prema instrukcijama proizvođača. Komercijalnom miksu dodato je po 0.5 µL svakog prajmera (20 pmol/µL), 1 µL DNK (30ng/µL) i 14 µL dejonizovane vode do ukupne zapremine od 20 µL po reakciji. Za amplifikaciju željenih fragmenata DNK korišćen je aparat SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, Inc, SAD). Temperaturna podešavanja za PCR reakciju data su u Tabeli 4.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za TNF- α - rs1800629.

Prajmeri	Sekvenca (smer 5'>3')
Niskohodni prajmer (eng. <i>reverse primer</i>)	5'- ACA CTC CCC ATC CTC CCT GCT - 3'
Uskohodni prajmer (eng. <i>forward primer</i>)	5'- CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT - 3'

Tabela 3. Protokol RFLP-PCR reakcije za odredjivanje G-308A TNF-alfa genskog polimorfizma

	Temperature (°C)	Trajanje (s)	
Inicijalna denaturacija	95°C	720s	
Denaturacija	95°C	30s	
Aniling	60°C	30s	33 ciklusa
Elongacija	72°C	90s	
Završna elongacija	72°C	300s	

Verifikacija PCR reakcije vršena je metodom horizontalne elektroforeze na 2% agaroznom gelu (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Severna Rajna Vestfalija, Nemačka). Kao pufer za elektroforezu i agarozni gel korišćen je 1XTBE pufer (Bio-Rad Laboratories, Herkules, Kalifornija, SAD). Uslovi za elektroforezu bili su napon od 100V, jačina struje 100mA, dok je trajanje elektroforeze iznosilo 75 minuta. Nakon završene horizontalne elektroforeze, agarozni

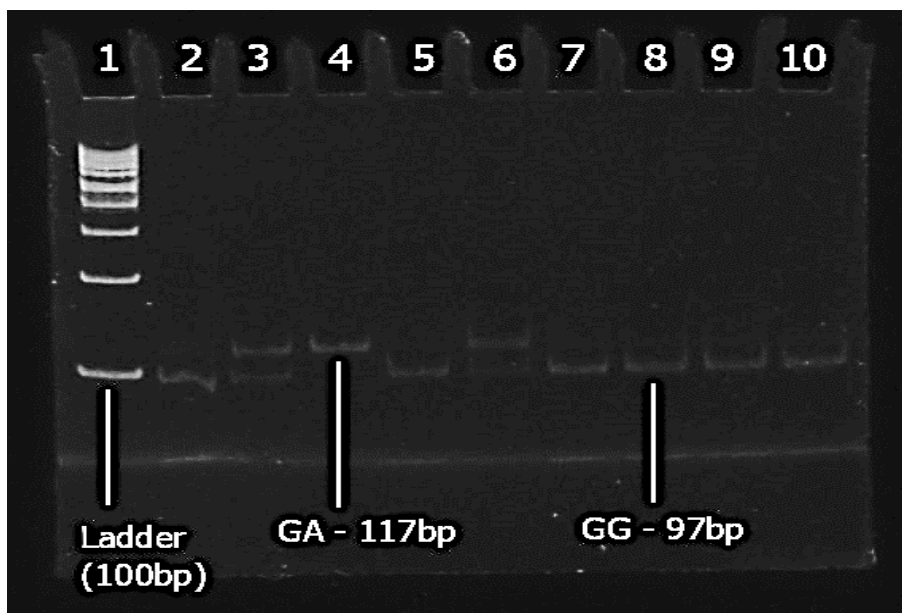
gel bojen je u etidijum bromidu 45 minuta, a zatim je veličina fragmenata posmatrana pomoću transiluminatora - MacroVue UV-20 transilluminator (Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD).

Nakon provere PCR produkta vršena je restrikciona digestija pomoću restrikcionog enzima NcoI (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Nemačka) u vodenom kupatilu na 37°C preko noći, prema instrukcijama proizvođača.

Dobijeni fragmenti separisani su na 8% poliaktilamidnoj gel na elektroforezi (PAGE). Za razdvajanje fragmenata korišćen je sistem za vertikalnu elektroforezu BioRad-Mini Protean Tetra-Cell system (Bio-Rad Laboratories, Herkules, Kalifornija, SAD). Uslovi za vertikalnu elektroforezu bili su napon od 120 V, jačina struje od 20 mA u trajanju od 75 minuta, a kao pufer korišćen je Tris-Borat-EDTA pufer - 1xTBE (Bio-Rad Laboratories, Herkules, Kalifornija, SAD).

Po završetku elektroforeze, razdvojeni fragmenti bojeni su u etidijum bromidu 8 minuta, a potom posmatrani pomoću transiluminatora - MacroVue UV-20 transilluminator (Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Takođe, poliakrilamidni gelovi posmatrani su pomoću gel dokumentacionog sistema - Quantum ST5 Vilber Lourmat gel documentation system (Vilber Lourmat, Collégien, Francuska). Analiza gelova je prikazana na slici 3.

Analizom dužine fragmenata DNK dobijenih restrikcionom digestijom utvrđivan je genotip svakog polimorfizma pojedinačno. Dužina trake od 97 baznih parova odgovara GG genotipu, 117 GA genotipu. Prisustvo obe trake odgovara heterozigotnom genotipu.



Slika 3. 8% PAGE za TNF- α polimorfizam rs1800629. Kolona 1: Standard dužine 100bp. Kolone 2,5,7-10: GG genotip dužine 97 bp. Kolona 3: Heterozigni genotip. Kolona 4 i 6: GA genotip dužine 117 bp.

Genotipizacija polimorfizama MDR1 C3435T (rs1045642) alel-specifičnom PCR metodom

Polimorfizam MDR1 gena - rs1045642 (C3435T) detektovan je alel specifičnom PCR metodom. Za određivanje ovog polimorfizma korišćena su tri prajmera čije su sekvence date u Tabeli 4. PCR reakcija pripremljena je korišćenjem komercijalnog kita HotFirePol® GC Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonija), po dobijenim uputstvima proizvođača. Ukupni volumen PCR smeše iznosio je 20 μ L po ependorfici. Svakoj reakciji dodato je po 0.5 μ L od svakog prajmera (koncentracije 10 pmol/ μ L), 1 μ L DNK (30ng/ μ L) i 13.5 μ L dejonizovane vode. Fragmenti su amplifikovani pomoću aparata SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, Inc, SAD). Uslovi PCR reakcije dati su u Tabeli 5.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za MDR1 - rs1045642.

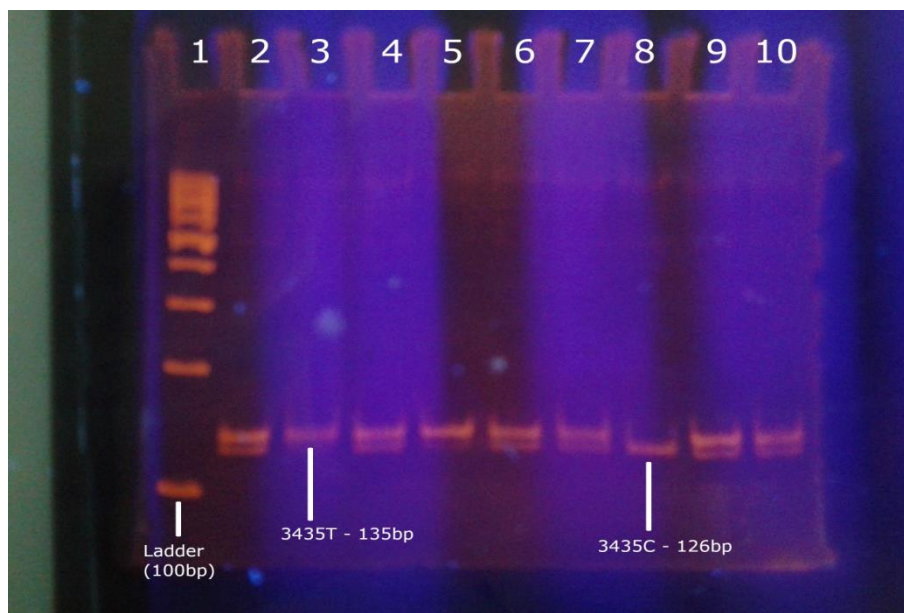
Prajmeri	Sekvenca (smer 5'>3')
3435 C	5'- GGT GTC ACA GGA AGA GAT C - 3'
3435 T	5'- CAG CCG GGT ATA GTC ACA GGA AGA TAT T - 3'
3435 rev	5'- GGC CAG AGA GGC TGC CAC AT - 3'

Tabela 5. Program i temperature PCR reakcije za MDR1 - rs1045642.

	Temperature (°C)	Trajanje (s)	
Inicijalna denaturacija	95°C	720s	
Denaturacija	95°C	30s	
Aniling	49°C	30s	33 ciklusa
Elongacija	72°C	90s	
Završna elongacija	72°C	300s	

Nakon amplifikacije DNK, PCR produkti su razdvojeni metodom 5% TBE poliakrilamidne gel elektroforeze (PAGE). Za PAGE metodu korišćen je 1XTBE kao pufer (Bio-Rad Laboratories, Herkules, Kalifornija, SAD). Uslovi za vertikalnu elektroforezu su bili: napon od 150 V, jačina struje od 20mA i trajanje od 55 minuta. Po završetku vertikalne elektroforeze, aparatom BioRad-Mini Protean Tetra-Cell system (Bio-Rad Laboratories, Herkules, Kalifornija, SAD), gelovi su bojeni etidijum bromidom u trajanju od 8 minuta, nakon čega su posmatrani na traniluminatoru - MacroVue UV-20 transilluminator (Hoefler Inc., Holliston, MA, SAD) i fotografisani gel dokumentacionim sistemom Quantum ST5 Vilber Lourmat gel documentation system (Vilber Lourmat, Collégien, Francuska).

Analizom dužine fragmenata DNK dobijenih PAGE metodom MDR1 polimorfizma utvrđivan je genotip svakog polimorfizma pojedinačno. Dužina trake od 135 baznih parova odgovara 3435T genotipu, a 126 baznih parova 3435C genotipu. Prisustvo obe trake odgovara heterozigotnom genotipu.



Slika 4. 5% PAGE za MDR1 polimorfizam rs1045642. Kolona 1: Standard dužine 100bp.

Kolone 2,4,6,7,9,10: heterozigotni genotip. Kolona 3 i 5: 3435TT genotip dužine 135 bp.

Kolona 8: 3435CC genotip dužine 126 bp.

Genotipizacija polimorfizama CYP3A5 (rs776746) alel-specifičnom PCR metodom

Ispitivanje polimorfizma gena CYP3A5 - rs776746 (A6986G) vršena je alel-specifičnom PCR metodom. Za ispitivanje ovog polimorfizma korišćena su tri prajmera čije su sekvence naznačene u Tabeli 6. Za PCR reakciju korišćen je komercijalni set HotFirePol® GC Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonija) prema protokolu proizvođača. Do ukupne zapremine od 20 μ L po tubici dodato je: po 0.5 μ L svakog prajmera koncentracije 20 pmol/ μ L, 1 μ L DNK (30ng/ μ L), i 13.5 μ L dejonizovane vode. Lančana reakcija polimerizacije je vršena pomoću aparata SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, Inc, SAD), a temperature za svaki korak su date u Tabeli 7.

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za CYP 3A5 - rs776746.

Prajmeri	Sekvenca (smer 5'>3')
Niskohodni prajmer (eng. <i>reverse primer</i>)	5'- CAC TTG ATG ATT TAC CTG CCT TC - 3'
Uskohodni prajmer (eng. <i>forward primer</i>)	5'- GGT CCA AAC AGG GAA GAG ATA T - 3'
Divlji tip	
Uskohodni prajmer (eng. <i>forward primer</i>) mutirani tip	5'- GGT CCA AAC AGG GAA GAG ATA C - 3'

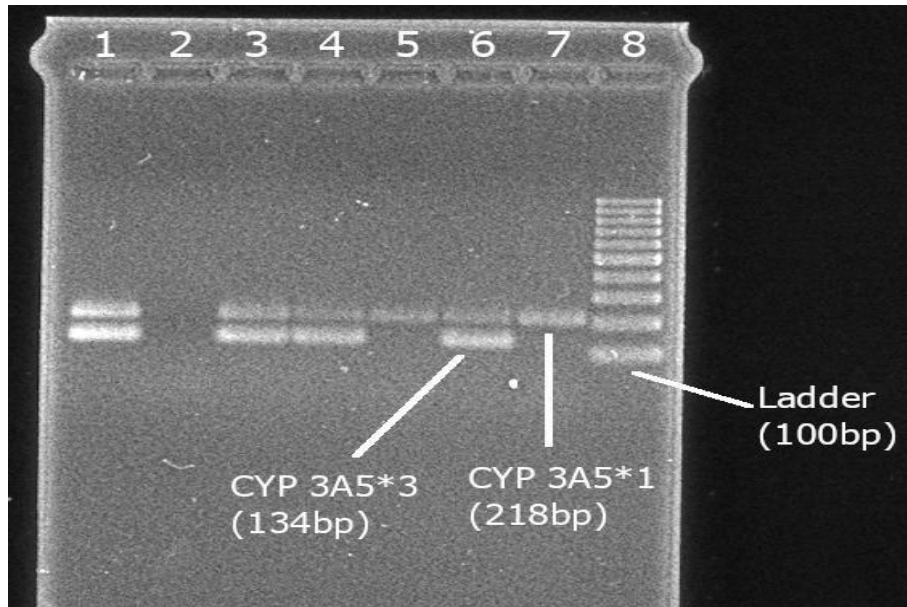
Tabela 7. Program i temperature PCR reakcije za CYP 3A5 - rs776746.

	Temperature (°C)	Trajanje (s)
Inicijalna denaturacija	95°C	720s
Denaturacija	95°C	30s
Aniling	60°C	30s
Elongacija	72°C	90s
Završna elongacija	72°C	300s

Razdvajanje fragmenata amplifikovane DNK radi detekcije polimorfizma rs776746 vršena je pomoću 2% gel agaroze (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Severna Rajna Vestfalija, Nemačka), sistemom za horizontalnu elektroforezu u puferu 1XTBE (Bio-Rad Laboratories, Herkules, Kalifornija, SAD). Podešavanja elektroforeze bila su: napon 110V, jačina struje 120 mA, trajanje elektroforeze 105 minuta. Separisani fragmenti DNK su zatim posmatrani na transiluminatoru - MacroVue UV-20 transilluminator (Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD), i fotografisani gel dokumentacionim sistemom Quantum ST5 Vilber Lourmat gel documentation system (Vilber Lourmat, Collégien, Francuska).

Analizom dužine fragmenata DNK dobijenih horizontalnom 2% agaroznom gel elektroforezom CYP3A5 polimorfizma utvrđivan je genotip svakog polimorfizma pojedinačno.

Dužina trake od 134 baznih parova odgovara CYP 3A5*1 genotipu, a 218 baznih parova CYP 3A5*3 genotipu. Prisustvo obe trake odgovara heterozigotnom genotipu.



Slika 5. 2% agarozna gel elektroforeza za CYP 3A5 polimorfizam rs776746. Kolona 1,3,4,6: heterozigot. Kolona 2: Negativna kontrola. Kolone 5 i 7: CYP 3A5*1. Kolona 8: Ladder (100bp)

Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani u vidu aritmetičke sredine, standardne devijacije, minimalne i maksimalne vrednosti, odnosno u vidu apsolutnih i relativnih brojeva. Za potrebe statističke obrade, registrovani genotipovi TNF-alfa, MDR1 i CYP3A5 gena kodirani su kao 0,1 i 2.

Normalnost distribucije podataka testirana je Kolmogorov Smirnof testom. Ukoliko je distribucija podataka bila normalna za poređenje vrednosti između dve grupe korišćen je t test, a između tri grupe ANOVA. Ukoliko distribucija podataka nije normalna za poređenje vrednosti između dve grupe korišćen je Mann-Whitney test, a između tri grupe Kruskal-Wallisov test. Za poređenje učestalosti različitih kategorijskih obeležja korišćen je Hi-kvadrat test. Hipoteza je testirana sa pragom značajnosti $p < 0,05$. Analiza podataka je vršena u programskom paketu SPSS 16.0.

5. REZULTATI

5.1. Rezultati demografskih i kliničkih parametara kliničke grupe

U istraživanje je uključeno 92 pacijenta (64 muškog pola i 28 ženskog pola). Prosečna starost ispitivane populacije je bila $66,44 \pm 8,89$ godina (min 38, max 86 godina). U ispitivanoj populaciji većina su pušači (59,3%), zatim bivši pušači (31,9%). Nepušača je svega 8,8% .

Tabela 8. Demografski i klinički parametri ispitivane populacije

Parametar	X \pm SD	Min-Max
Starost	66,44 \pm 8,89	38-86
BMI	22,39 \pm 7,38	14,40-52,10
FEV1	1,47 \pm 0,77	0,33-3,44
FEV1%	52,76 \pm 22,43	16,60-105
FVC	2,73 \pm 1,17	0,68-6,07
FVC%	77,51 \pm 24,46	28,90-152,50
CAT	25,12 \pm 9,43	5-40
Mmrc	2,45 \pm 1,12	0-4

Osnovni biohemijski parametri bolesnika sa HOBP prikazani su u tabeli 9. Bolesnici uključeni u istraživanje imali su povećan broj leukocita, limfocita i neutrofila, ubrzanu sedimentaciju i povećane vrednosti CRP, dok su prosečan broj trombocita, eritrocita, hemoglobin i hematokrit bili u granicama referentnih vrednosti.

Tabela 9. Osnovni biohemijski parametri u ispitivanoj populaciji

Parametar	N	AS±SD	Min-Max
Le	88	10,89±5,3	4,3-29,3
Ly	82	3,69±3,47	0,05-16,8
Eritrociti	88	4,66±0,78	2,67-8,1
Trombociti	87	258,22±114,38	97-650
Hgb	86	138,74±23,02	77-248
Hct	85	0,42±0,07	0,26-0,65
CRP	86	62,18±95,19	0,4-394
SE	73	34,37±25,74	4-100
Na⁺	86	137,4±3,57	129-144,6
K⁺	86	4,44±0,69	3-6,2
Neutrofili	82	7,41±4,01	1,66-25,6
Ne/ Ly	77	0,73±1,10	0,01-8,79

Tabelom br 10 prikazano je prisustvo komorbiditeta kod ispitanika kliničke grupe.

Tabela 10. Prisustvo komorbiditeta u ispitivanoj populaciji

	Broj	%
Bez komorbiditeta	20	21,7
HTA	61	66,3
DM	21	22,8
Osteoporoza	15	16,3
KVS	18	19,6
RA	4	4,3
Sy depresivum	10	10,9
Plućna infiltracija	4	4,3

U ispitivanoj populaciji petina pacijenata (21,7%) nije imala komorbiditete. Dve trećine pacijenata (66,3%) je imalo hipertenziju. Dijabetes mellitus je prisutan kod 22,8% pacijenata. Osteoporoza je prisutna kod 16,3% pacijenata. Kardiovaskularna oboljenja su prisutna kod 19,6% pacijenata. Reumatoidni artritis je prisutan kod 4,3% pacijenata. Depresivni sindrom je prisutan kod 10,9% pacijenata, a infiltracija pluća kod 4,3% pacijenata (Tabela10).

Kod bolesnika sa HOBP uključenih u ovo istraživanje, nije bilo statistički značajne povezanosti ispitivanih kliničkih parametara sa odnosom Ne/Ly (Tabela 11).

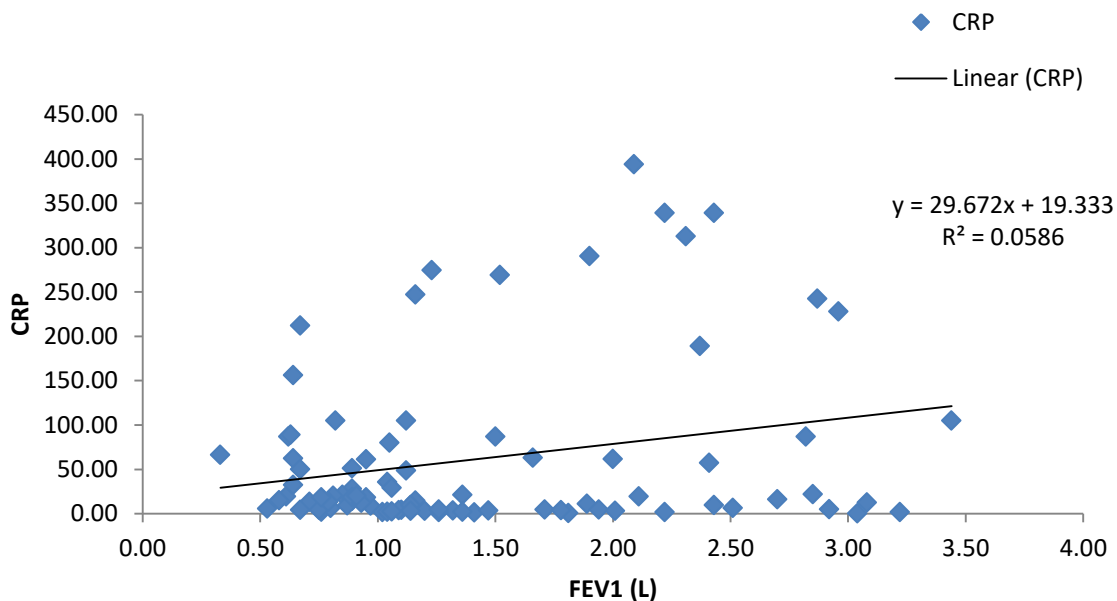
Tabela 11. Korelacija Ne/Ly odnosa sa kliničkim parametrima

	Ne/Ly
FEV1	-0,002 0,988
FEV1%	0,048 0,678
FVC	0,000 0,999
FVC%	0,116 0,314
Broj egzercerbacija	0,027 0,817
Broj hospitalizacija	0,182 0,116

Korelaciona analiza je pokazala da postoji statistički značajna negativna korelacija između FEV1 i broja leukocita ($r=-0,252$, $p=0,018$) (Tabela 12, Grafikon 1)

Tabela 12. Korelacija FEV1 i FEV1% sa CRP, brojem leukocita i SE

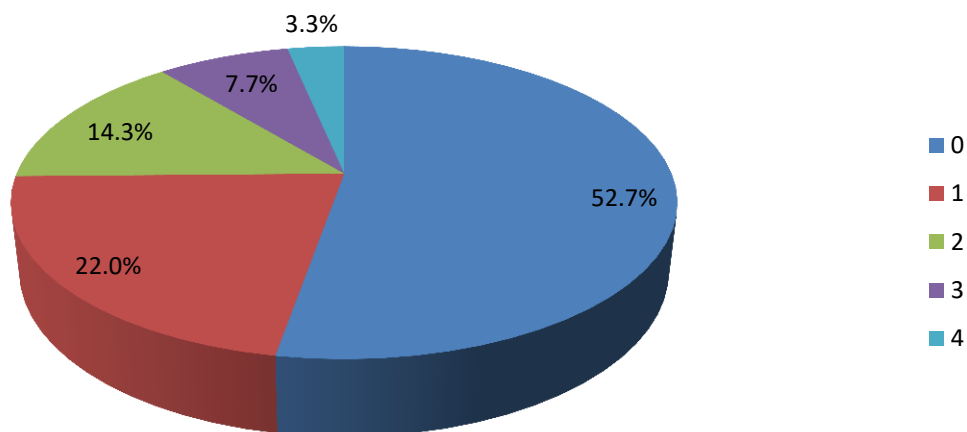
	FEV1%	CRP	LE	SE
FEV1	0,915 <0,001	-0,005 0,960	-0,252 0,018	-0,113 0,343
FEV1%	-	0,043 0,697	-0,187 0,082	-0,139 0,240



Grafikon 1. Korelacija FEV1 i CRP kod bolesnika sa HOBP

U ispitivanoj populaciji većina pacijenata nije bila hospitalizivana – 48 pacijenata (52,7%).

Broj hospitalizacija



Grafikon 2. Broj hospitalizacija u ispitivanoj populaciji

Jednu hospitalizaciju je imalo 20 pacijenata (22,0%), dve hospitalizacije je imalo 13 pacijenata (14,3%), tri hospitalizacije je imalo 7 pacijenata (7,7%) i četiri hospitalizacije su imala tri pacijenta (3,3%) (Grafikon 2).

Utvrđeno je da je broj egzacerbacija i broj hospitalizacija statistički značajno veći kod pacijenata sa FEV1≤50% (Tabela 13). Vrednosti CAT i mMRC su statistički značajno veće kod pacijenata sa FEV1≤50% (p<0,001, odnosno p<0,001) (Tabela 13).

Tabela 13. Broj egzacerbacija i hospitalizacija u odnosu na vrednost FEV1≤50%

	FEV1≤50%	FEV1>50%	p-vrednost ¹
Broj egzacerbacija	7,02±3,02	2,37±1,52	<0,001
Broj hospitalizacija	1,35±1,19	0,14±0,42	<0,001
CAT	31,22±5,69	16,05±5,92	<0,001
mMRC	3,05±0,95	1,54±0,65	<0,001

¹ Mann-Whitney test

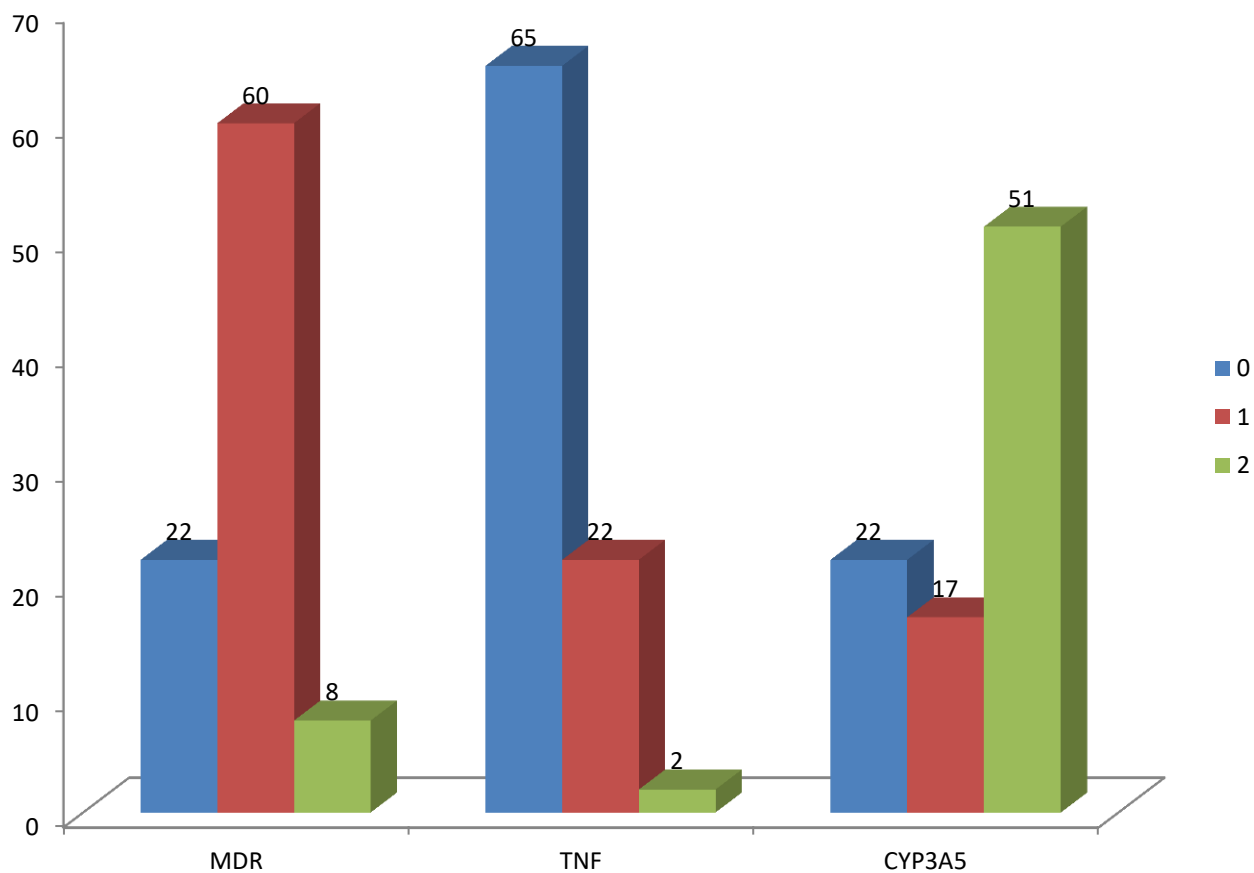
BMI je statistički značajno veći kod pacijenata sa retkim egzacerbacijama (p=0,034) (Tabela 14). CAT i mMRC je statistički značajno veći kod pacijenata sa čestim egzacerbacijama (p=0,001, odnosno p<0,001). FEV1 (lit) i FEV1 (%) su značajno veći kod pacijenata sa retkim egzacerbacijama (p=0,001, odnosno p<0,001) (Tabela 14)

Tabela 14. Povezanost učestalosti FEV1%, BMI, CAT i mMRC sa učestalosti egzacerbacija

Parametar	Retki		Česti		p-vrednost ¹
	N	%	N	%	
FEV1%					
≤50	3	21,4	50	68,0	0,003
>50	11	78,6	24	32,0	
BMI	26,10±8,86		21,54±6,88		0,034 ²
CAT	13,93±5,82		27,55±7,99		<0,001 ²
mMRC	1,21±0,70		2,69±1,01		<0,001 ²

¹ Hi-kvadrat test, ²Mann-Whitney test

5.2. Učestalost genskih polimorfizama MDR1, C3435T, TNF- α G-308A i CYP3A5*1*3 kod ispitanika kliničke grupe



Grafikon 3. Distribucija polimorfizama MDR, TNF i CYP3A5 unutar kliničke grupe

MDR1: 0 - 3435 CC, 1 - 3435CT, 2 - 3435TT

TNF-alfa: 0 - (-308)GG, 1 - (-308)GA, 2 - (-308)AA

CYP3A5: 0 - *1, 1 - *3*1, 2 - *3

5.2.1. Frekvencija različitih haplotipa MDR, TNF i CYP3A5 polimorfizama kod bolesnika sa HOBP

U ispitivanoj populaciji samo četiri pacijenta su imali kombinaciju ispitivanih polimorfizama kodiranu kao 0/0/2 (MDR1 3435CC, TNF-alfa (-308)GG CYP3A5*3) – 4,5%. Najčešća kombinacija je bila 1/0/2 – 33,7% pacijenata, zatim sledi 0/0/0 kod 14,6% pacijenata i 1/1/2 kod 11,2% i kombinacija 1/0/1 kod 10,1% ispitivanih pacijenata (Tabela 15, Grafikon 4).

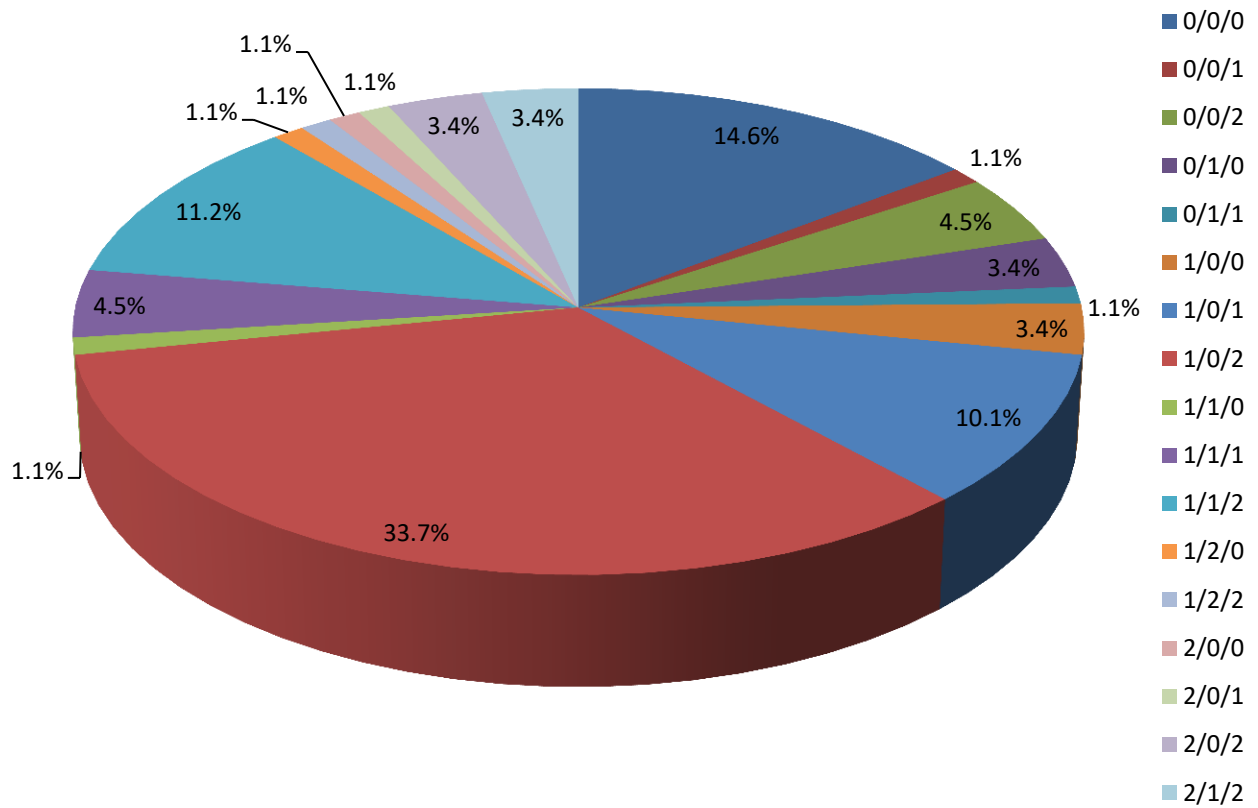
Tabela 15. Genotipi MDR1/TNF alfa /CYP3A5 polimorfizma u ispitivanoj populaciji

MDR/TNF/CYP	N	%
0/0/0	13	14,6
0/0/1	1	1,1
0/0/2	4	4,5
0/1/0	3	3,4
0/1/1	1	1,1
1/0/0	3	3,4
1/0/1	9	10,1
1/0/2	30	33,7
1/1/0	1	1,1
1/1/1	4	4,5
1/1/2	10	11,2
1/2/0	1	1,1
1/2/2	1	1,1
2/0/0	1	1,1
2/0/1	1	1,1
2/0/2	3	3,4
2/1/2	3	3,4

MDR1: 0 - 3435 CC, 1 – 3435CT, 2 – 3435TT

TNF-alfa: 0 – (-308)GG, 1 - (-308)GA, 2 - (-308)AA

CYP3A5: 0 - *1, 1 - *3*1, 2 - *3

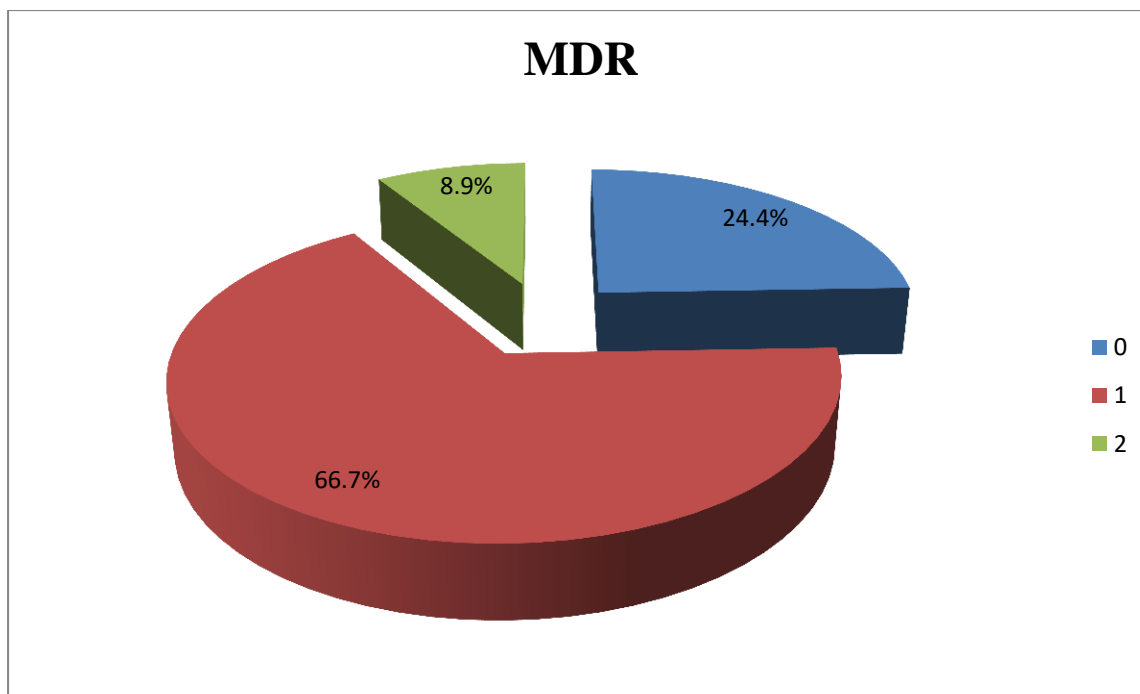


Grafikon 4. Kombinacije MDR/TNF/CYP polimorfizma u ispitivanoj populaciji

MDR1: 0 - 3435 CC, 1 - 3435CT, 2 - 3435TT
 TNF-alfa: 0 - (-308)GG, 1 - (-308)GA, 2 - (-308)AA
 CYP3A5: 0 - *1, 1 - *3*1, 2 - *3

5.3. Rezultati genotipizacije MDR1 C3435T polimorfizma

U populaciji bolesnika sa HOBP, utvrđeno je da 22 pacijenta imaju genotip MDR 3435CC (24,4%), 60 pacijenata imaju MDR 3435CT (66,7%) i 8 pacijenata imaju MDR 3435TT (8,9%) (Grafikon 5).



**Grafikon 5. Distribucija MDR polimorfizma u ispitivanoj populaciji
(0-3435 CC, 1-3435CT, 2-3435TT)**

Analiza demografskih i kliničkih parametara u odnosu na MDR polimorfizam je pokazala da su svi testirani parametri ujednačeni u odnosu na različite MDR polimorfizme, osim prisustva komorbiditeta ($p=0,010$) (Tabela 16). Komorbiditeti su najčešći kod pacijenata sa MDR 3435TT (87,5%) i pacijenata sa MDR 3435CT (86,7%). Utvrđeno je da je prisustvo komorbiditeta statistički značajno češće kod MDR 3435CT u odnosu na MDR 3435CC ($p=0,005$).

Tabela 16. Demografske i kliničke karakteristike u odnosu na MDR polimorfizam

Parametar	MDR polimorfizam			p ¹
	0	1	2	
Starost	62,50±8,62	67,50±8,92	68,51±7,89	0,062 ²
Pol				
Muški	17 81,0	39 66,1	6 75,0	0,403 ³
Ženski	4 19,0	20 33,9	2 25,0	
Pušenje				
Nepušači	0 0,0	8 13,6	0 0,0	0,063 ³
Pušači	17 77,3	31 52,5	5 62,5	
Bivši pušači	5 22,7	20 33,9	3 37,5	
Prisustvo komorbiditeta	12 54,5	52 ⁴ 86,7	7 87,5	0,010 ³
BMI	22,44±5,65	21,89±7,96	25,75±7,19	0,063
FEV1	1,66±0,76	1,35±0,74	1,51±0,80	0,236
FEV1%	53,28±19,96	51,32±21,88	51,30±25,88	0,897
FEV1%≤50	11 50,0	39 65,0	5 62,5	0,471 ³
FVC	2,98±1,15	2,57±1,16	2,86±0,95	0,224
FVC%	78,53±22,07	75,84±24,31	76,38±21,58	0,836
CAT	24,45±10,40	25,85±8,64	25,25±11,46	0,920
Mmrc	2,55±1,14	2,45±1,08	2,50±1,41	0,953
Broj egzercerbacija	5,29±3,49	5,22±3,34	5,75±3,81	0,960
Broj hospitalizacija	0,73±1,20	0,97±1,16	0,75±0,71	0,465

¹Kruskal-Wallis test, ²ANOVA, ³Hi-kvadrat test, ⁴vs MDR 0

(0-3435 CC, 1-3435CT, 2-3435TT)

Distribucija BMI kategorija se ujednačena u odnosu na MDR polimorfizam (p=0,409) (Tabela 17).

Tabela 17. Distribucija BMI kategorija u odnosu na MDR1 C3435T polimorfizam

BMI kategorije	MDR polimorfizam						p ¹
	0		1		2		
≤18,5	7	36,8	28	48,3	5	25,0	0,409
18,5-24,9	7	36,8	16	27,6	2	25,0	
25-29,9	2	10,5	7	12,1	2	25,0	
30-34,9	3	15,8	2	3,4	1	12,5	
35-39,9	0	0,0	2	3,4	1	12,5	
≥40	0	0,0	3	5,2	0	0,0	

¹ Hi-kvadrat test

(0-3435 CC, 1-3435CT, 2-3435TT)

Broj leukocita se statistički značajno razlikuje u odnosu na MDR polimorfizam (p=0,007). Najveće vrednosti imali su bolesnici koji su nosioci genotipa MDR1 3435 TT, a najmanje vrednosti MDR1 MDR1 3435 CC. *Post hoc* analiza je pokazala da se broj leukocita statistički značajno razlikuje između MDR1 3435 CC i MDR1 3435 TT (p=0,011), MDR1 3435 CC i MDR1 3435 CT (p=0,013). Koncentracija hemoglobina se statistički značajno razlikuje u odnosu na MDR polimorfizam. Najveće koncentracije imaju pacijenti sa genotipom MDR1 3435 CT, a najmanje sa MDR1 3435 TT. Daljom analizom je utvrđeno da statistički značajna razlika postoji između: MDR 1 i MDR1 3435 TT (p=0,032), MDR1 3435 CT i MDR1 3435 CC (p=0,044). Hematokrit se statistički značajno razlikuje u odnosu na MDR polimorfizam. Najveće vrednosti imaju pacijenti sa MDR1 3435 CT, a najmanje sa MDR1 3435 TT. *Post hoc* analizom je pokazano da statistički značajna razlika postoji između MDR i MDR 2 (p=0,031). Sedimentacija se statistički značajno razlikuje u odnosu na MDR polimorfizam (p=0,033). Najveće vrednosti ima MDR1 3435 TT, a najmanje vrednosti MDR1 3435 CC. Daljom analizom je pokazano da statistički značajna razlika postoji između: MDR1 3435 CC i MDR1 3435 TT (p=0,015).

Tabela 18. Biohemijski parametri u odnosu na MDR polimorfizam

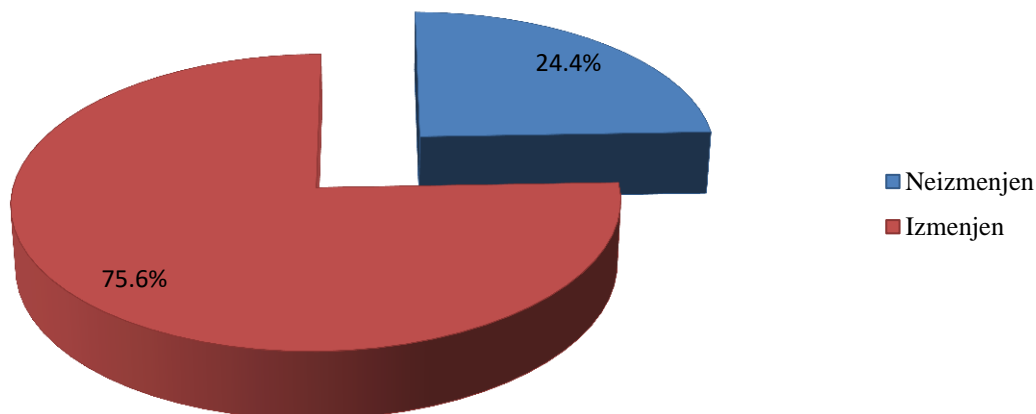
Parametar	MDR polimorfizam			p ¹
	0	1	2	
Le	8,56±2,96	11,40±5,62 ³	14,41±5,14 ³	0,007
Ly	3,95±4,40	3,89±3,35	1,84±0,34	0,054
Er	4,54±1,13	4,74±0,64	4,41±0,78	0,404 ²
Tr	232,90±92,89	264,40±112,43	290,88±178,62	0,506
Hgb	129,84±23,66 ⁴	143,93±21,84	124,63±22,47 ⁴	0,025
Hct	0,40±0,07	0,44±0,06	0,38±0,06 ⁴	0,024 ²
CRP	29,11±46,19	63,58±98,21	109,82±117,58	0,070
SE	25,06±22,67	34,61±24,61	57,40±25,35 ³	0,033
Na⁺	137,77±3,73	137,45±3,39	136,55±4,93	0,728 ²
K⁺	4,35±0,63 ⁵	4,38±0,71 ⁵	5,09±0,40	0,020 ²
pH	7,46±0,03	7,43±0,04	7,39±0,07	0,059 ²
pCO2	4,78±1,29	7,89±11,98	6,02±4,10	0,746
pO2	12,60±9,00	9,95±7,86	9,10±3,51	0,878
HCO3	26,52±7,64	28,10±6,94	24,42±10,29	0,568
Be	2,50±7,92	3,16±8,52	1,08±11,75	0,796
sO2	91,40±6,37	90,63±4,45	89,75±8,78	0,913 ²
Ne	7,41±3,49	7,31±4,22	9,08±3,57	0,341
Ly/Ne	0,70±0,75	0,79±1,24	0,26±0,15	0,093

¹ Kruskal-Wallis test, ² ANOVA, ³ vs MDR1 - 0, ⁴ vs MDR1 - 1, ⁵ vs MDR1 - 2

(0-3435 CC, 1-3435CT, 2-3435TT)

5.4. Odnos MDR1 3435CT i 3435TT i kliničkih parametara HOBP bolesnika

MDR1 T alel bio je prisutan kod 68 ispitivanih pacijenata sa HOBP (75,6%) (grafikon 6).



Grafikon 6. Učestalost T alela MDR1 3435 polimorfizma
(Neizmenjen – C alel, izmenjen – T alel)

Nosioci T alela su statistički značajno češće bili pušači ($p=0,035$). Komorbiditeti su statistički značajno češće prisutni kod pacijenata koji su nosioci T alela MDR1 gena ($p=0,005$) (tabela 19).

Tabela 19. Demografske i kliničke karakteristike u odnosu na MDR polimorfizam

Parametar	MDR1 alel				p ¹
	C		T		
Starost	62,50±8,62		67,68±8,66		0,016 ²
Pol					
Muški	17	81,0	47	68,1	0,389 ³
Ženski	4	19,0	22	31,9	
Pušenje					
Nepušači	0	0,0	8	11,6	0,035 ³
Pušači	17	77,3	37	53,6	
Bivši pušači	5	22,7	24	34,8	
Prisustvo komorbiditeta	12	54,5	60	85,7	0,005 ³
BMI	22,44±5,65		22,38±7,86		0,408
FEV1	1,66±0,76		1,41±0,77		0,145
FEV1%	53,28±1,15		52,59±23,29		0,808
FEV1%≤50	11	50,0	44	62,9	0,410 ³
FVC	2,98±1,15		2,65±1,17		0,166
FVC%	78,53±22,07		77,19±25,29		0,694
CAT	24,45±10,40		25,33±9,18		0,822
Mmrc	2,55±1,14		2,41±1,12		0,654
Broj egzercerbacija	5,29±3,49		5,16±3,40		0,865
Broj hospitalizacija	0,73±1,20		0,91±1,11		0,255

¹ Kruskal-Wallis test, ² ANOVA, ³ Hi-kvadrat test, ⁴ vs MDR 0

Broj leukocita je statistički značajno veći kod pacijenata sa HOBP koji su nosioci T alela MDR1 3435 polimorfizma (p=0,012). Ostali biohemijski parametri se ne razlikuju statistički značajno u odnosu na MDR1 polimorfizam (Tabela 21).

Tabela 20. Biohemijski parametri u odnosu na MDR polimorfizam

Parametar	MDR1 3435 alel		p ¹
	C	T	
Le	8,56±2,96	11,57±5,65	0,012
Ly	3,95±4,40	3,61±3,20	0,361
Er	4,54±1,13	4,70±0,64	0,428 ²
Tr	232,90±92,89	265,78±119,63	0,265
Hgb	129,84±23,66 ⁴	141,27±22,38	0,101
Hct	0,40±0,07	0,43±0,06	0,212 ²
CRP	29,11±46,19	71,56±103,36	0,145
SE	25,06±22,67	37,20±26,13	0,052
Na⁺	137,77±3,73	137,30±3,55	0,631 ²
K⁺	4,35±0,63 ⁵	4,46±0,71	0,506 ²
pH	7,46±0,03	7,42±0,05	0,034 ²
pCO2	4,78±1,29	7,41±10,76	0,645
pO2	12,60±9,00	9,63±7,13	0,767
HCO3	26,52±7,64	26,91±7,79	0,743
Be	2,50±7,92	2,24±9,01	0,824
sO2	91,40±6,37	90,02±5,56	0,706 ²
Ne	7,41±3,49	7,41±4,17	0,886
Ly/Ne	0,70±0,75	0,74±1,18	0,681

¹Kruskal-Wallis test, ²ANOVA, ³vs MDR1 3435 C, ⁴vs MDR1 3435T ⁵

5.5. Polimorfizam TNF alfa gena

Demografski i klinički parametri (osim starosti i pola bolesnika) su statistički ujednačeni u odnosu na prisustvo genotipa TNF – alfa (-308)GA polimorfizma, što je prikazano Tabelom 22.

Tabela 21. Demografske i kliničke karakteristike u odnosu na TNF polimorfizam

Parametar	TNF polimorfizam			p ¹
	0	1	2	
Starost	66,12±9,38	67,41±8,14	66,50±4,95	0,848 ²
Pol				
Muški	49 76,6	10 47,6	2 100,0	0,025 ³
Ženski	15 23,4	11 52,4	0 0,0	
Pušenje				
Nepušači	0 0,0	8 13,6	0 0,0	0,063 ³
Pušači	17 77,3	31 52,5	5 62,5	
Bivši pušači	5 22,7	20 33,9	3 37,5	
Prisustvo komorbiditeta	53 81,5	13 72,7	2 100,0	0,436 ³
BMI	21,78±7,36	24,09±7,17	27,19±13,42	0,128
FEV1	1,46±0,76	1,38±0,78	1,62±0,67	0,236
FEV1%	51,41±21,86	52,09±21,78	61,60±24,75	0,897
FEV1%≤50	40 61,5	14 63,6	1 50,0	0,929 ³
FVC	2,74±1,13	2,51±1,21	3,00±1,47	0,224
FVC%	76,23±23,04	75,99±24,52	86,80±39,88	0,836
CAT	25,71±9,21	25,73±9,35	19,50±13,43	0,920
Mmrc	2,52±1,12	2,45±1,10	2,00±1,41	0,953
Broj egzacerbacija	5,42±3,45	5,20±3,32	3,00±2,83	0,960
Broj hospitalizacija	0,81±1,05	1,18±1,37	0,50±0,71	0,465

¹Kruskal-Wallis test, ²ANOVA, ³Hi-kvadrat test, ⁴ vs MDR 0

TNF-alfa: 0 – (-308)GG, 1 - (-308)GA, 2 - (-308)AA

Wild type TNF alfa je najčešći kod pacijenata sa BMI≤18,5 kao i heterozigotni oblik TNF alfa.

Distribucija BMI kategorija je ujednačena u odnosu na TNF polimorfizam (p=0,119)(Tabela 23).

Tabela 22. Distribucija BMI kategorija u odnosu na TNF polimorfizam

BMI kategorije	TNF polimorfizam						p ¹
	0		1		2		
≤18,5	29	46,8	6	30,0	1	50,0	0,119
18,5-24,9	19	30,6	6	30,0	0	0,0	
25-29,9	7	11,3	4	20,	0	0,0	
30-34,9	4	6,5	2	10,0	0	0,0	
35-39,9	0	0,0	2	10,0	1	50,0	
≥40	3	4,8	0	0,0	0	0,0	

¹ Hi-kvadrat test

TNF-alfa: 0 – (-308)GG, 1 - (-308)GA, 2 - (-308)AA

Broj trombocita je statistički značajno različit kod nosilaca različitih genotipa TNF-alfa (-308)GA polimorfizma (p=0,018). Najveće vrednosti imaju pacijenti sa TNF-alfa (-308)GG, a najmanje vrednosti pacijenti sa TNF-alfa (-308)AA. Daljom analizom je pokazano da statistički značajna razlika u broju trombocita postoji između: TNF-alfa (-308)GG vs TNF-alfa (-308)GA (p=0,006). Vrednosti trombocita su bile u referentnim granicama, te se navedeni rezultati ne mogu smatrati značajnim. Vrednost pH se statistički značajno razlikuje u odnosu na TNF polimorfizam (p=0,047). Utvrđeno je da razlika postoji između TNF-alfa (-308)GG i TNF-alfa (-308)GA (p=0,024).

Tabela 23. Biohemijski parametri u odnosu na TNF polimorfizam

Parametar	TNF polimorfizam			p ¹
	0	1	2	
Le	11,31±4,99	10,74±6,24	5,94±1,49	0,082
Ly	4,07±3,95	2,87±1,60	2,00	0,803
Er	4,62±0,70	4,78±1,02	4,52±0,59	0,688 ²
Tr	279,95±118,66	209,43±95,22 ³	206,00±18,38	0,018
Hgb	138,67±25,28	138,95±18,17	140,50±14,85	0,990
Hct	0,42±0,07	0,42±0,08	0,44±0,09	0,939 ²
CRP	57,68±84,76	56,83±93,01	198,60±276,33	0,870
SE	36,06±26,15	27,00±18,27	42,00±53,74	0,579
Na	137,63±3,61	136,88±3,84	137,50±2,12	0,731 ²
K	4,48±0,71	4,41±0,68	3,95±0,21	0,560 ²
pH	7,44±0,04	7,40±0,05 ³	7,39	0,047 ²
pCO2	4,97±1,46	10,98±16,37	3,90	0,289
pO2	9,37±4,54	11,80±10,91	8,00	0,999
HCO3	27,49±6,95	27,77±8,35	20,10	0,367
Be	2,83±8,84	3,39±8,76	-5,90	0,468
sO2	92,12±2,48	88,22±7,72	90,30	0,188 ²
Ne	7,95±4,24	6,92±3,07	2,10±0,56	0,067
Ne/Ly	0,77±1,24	0,57±0,14	1,18	0,484

¹ Kruskal-Wallis test, ² ANOVA, ³ vs TNF-alfa (-308)GG
TNF-alfa: 0 – (-308)GG, 1 - (-308)GA, 2 - (-308)AA

Broj neutrofila bio je statistički značajno veći u grupi bolesnika sa TNFalfa 0 u odnosu na TNF-alfa 1 i TNF-alfa 2.

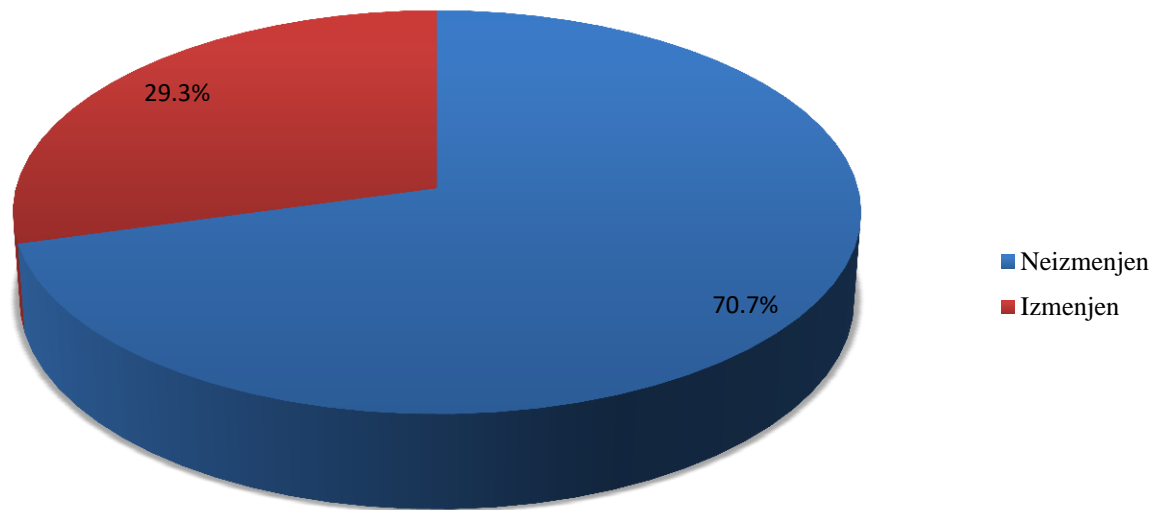
5.6. Korelacija kliničkih parametara sa prisustvom alela TNF-alfa (-308)GA polimorfizma

Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa HOBP u odnosu na prisustvo alela TNF-alfa (-308) GA polimorfizma prikazane su tabelom 24. Nijedan od ispitivanih parametara nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na prisustvo G ili T alela kod bolesnika.

Tabela 24. Demografske i kliničke karakteristike u odnosu na alele TNF-alfa (-308)

Parametar	TNF polimorfizam				p ¹
	0		1		
Starost	66,12±9,38		67,22±7,68		0,561 ²
Pol					
Muški	49	76,6	15	57,7	0,125 ³
Ženski	15	23,4	11	42,3	
Pušenje					
Nepušači	7	10,9	1	3,7	0,421 ³
Pušači	36	56,2	18	66,7	
Bivši pušači	21	32,8	8	29,6	
Prisustvo komorbiditeta	42	81,5	19	70,4	0,365
BMI	21,78±7,36		24,02±7,36		
FEV1	1,46±0,76		1,48±0,80		0,847
FEV1%	51,41±21,86		55,98±23,88		0,501
FEV1%≤50	40	61,5	15	55,6	0,765 ³
FVC	2,74±1,13		2,70±1,28		0,706
FVC%	76,23±23,04		80,62±27,79		0,471
CAT	25,71±9,21		23,70±9,98		0,369
Mmrc	2,52±1,12		2,23±1,13		0,284
Broj egzercerbacija	5,42±3,45		4,60±3,27		0,335
Broj hospitalizacija	0,81±1,05		1,00±1,30		0,680

¹ Mann-Whitney test, ² t tets, ³ Hi-kvadrat test; 0 - G alel, 1 – A alel.



Grafikon 7. Učestalost G i A alela TNF-alfa (-308) polimorfizma u kliničkoj grupi; neizmenjen –G, izmenjen – A

Broj leukocita i trombocita je statistički značajno veći kod pacijenata sa wild type oblikom TNF alfa gena ($p=0,045$, odnosno $p=0,002$). Vrednost pH je statistički značajno veća kod pacijenata sa neizmenjenim TNF polimorfizmom ($p=0,016$) (Tabela br 25).

Tabele 25. Biohemijski parametri u odnosu na prisustvo alela TNF-alfa (-308) polimorfizma

Parametar	TNF polimorfizam		p ¹
	0	1	
Le	11,31±4,99	9,93±5,93	0,045
Ly	4,07±3,95	2,76±1,61	0,531
Er	4,62±0,70	4,75±0,93	0,497 ²
Tr	279,95±118,66	207,23±85,78	0,002
Hgb	138,67±25,28	138,92±16,72	0,973
Hct	0,42±0,07	0,43±0,07	0,815 ²
CRP	57,68±84,76	73,17±118,11	0,634
SE	36,06±26,15	30,45±24,89	0,364
Na⁺	137,63±3,61	136,86±3,50	0,369 ²
K⁺	4,48±0,71	4,34±0,65	0,412 ²
pH	7,44±0,04	7,40±0,04	0,016 ²
pCO2	4,97±1,46	9,73±15,07	0,659
pO2	9,37±4,54	10,97±10,07	0,767
HCO3	27,49±6,95	26,01±8,69	0,444
Be	2,83±8,84	1,69±8,87	0,624
sO2	92,12±2,48	87,68±7,45	0,034 ²
Ne	7,95±4,24	6,19±3,18	0,077
Ly/Ne	0,77±1,24	0,63±0,64	0,928

¹Mann-Whitney test, ²t tets, ³Hi-kvadrat test; 0 – G alel, 1 – A alel

5.7. Rezultati u odnosu na CYP3A5*3*1 polimorfizam

Analiza demografskih i kliničkih parametara u odnosu na CYP3A5 polimorfizam je pokazala da su komorbiditeti statistički značajno češći kod bolesnika koji su neekspresori CYP3A5 gena ($p=0,025$). Rezultati su prikazani Tabelom 26.

Tabela 26. Demografske i kliničke karakteristike u odnosu na CYP3A5

Parametar	CYP3A5						p ¹
	0		1		2		
Starost	62,36±9,35		66,53±9,80		68,04±8,08 ⁴		0,044 ²
Pol							
Muški	17	81,0	14	82,4	31	62,0	0,127 ³
Ženski	4	19,0	3	17,6	19	38,0	
Pušenje							
Nepušači	1	4,5	2	11,8	5	10,0	0,104 ³
Pušači	18	81,8	7	41,2	28	56,0	
Bivši pušači	3	13,6	8	47,1	17	34,0	
Prisustvo komorbiditeta	13	59,1	13	76,5	45	88,2	0,023 ³
BMI	22,07±5,71		24,24±9,82		21,89±7,24		0,836
FEV1	1,48±0,77		1,60±0,81		1,37±0,74		0,413
FEV1%	48,90±19,94		55,33±21,88		51,87±22,34		0,495
FEV1%≤50	15	68,2	8	47,1	32	62,7	0,386
FVC	2,78±1,10		2,97±1,32		2,56±1,10		0,411
FVC%	75,30±22,79		81,97±27,79		75,26±22,22		0,612
CAT	26,59±0,26		24,65±8,18		25,24±9,28		0,570
Mmrc	2,82±1,14		2,35±1,00		2,37±1,13		0,261
Broj egzercerbacija	6,38±3,61		4,76±2,51		5,00±3,50		0,242
Broj hospitalizacija	0,95±1,17		0,76±1,09		0,90±1,15		0,850

¹ Kruskal-Wallis test, ² ANOVA, ³ Hi-kvadrat test, ⁴ vs CYP3A5*1; 0 – CYP3A5*1, 1 – CYP3A5*1*3, 2 – CYP3A5*3

Distribucija BMI kategorija je ujednačena u odnosu na genotipe CYP3A5*3 polimorfizma ($p=0,119$) (Tabela 27).

Tabela 27. Distribucija BMI kategorija u odnosu na CYP3A5

BMI kategorije	CYP3A5						p ¹
	0		1		2		
≤18,5	8	40,0	6	37,5	23	46,9	0,196
18,5-24,9	7	35,0	5	31,2	13	26,5	
25-29,9	2	10,0	1	6,2	8	16,3	
30-34,9	3	15,0	2	12,5	1	2,0	
35-39,9	0	0,0	0	0,0	3	6,1	
≥40	0	0,0	2	12,5	1	2,0	

¹Hi-kvadrat test; 0 – CYP3A5*1, 1 – CYP3A5*1*3, 2 – CYP3A5*3

Nema signifikantne razlike osnovnih biohemijskih parametara iz krvi bolesnika sa HOBP u odnosu na nosioce različitih genotipa CYP3A5*3 gena (Tabela 28).

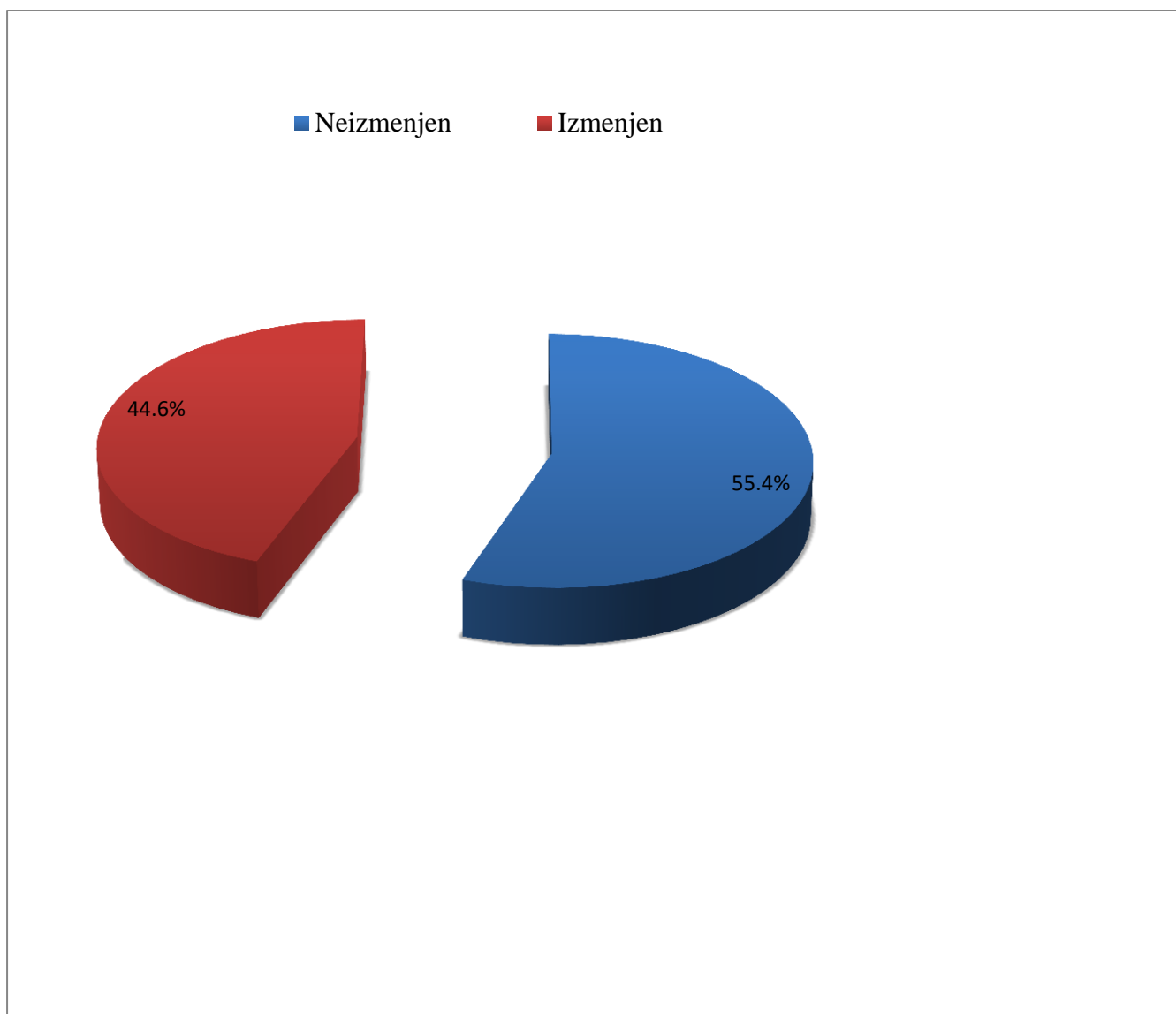
Tabela 28. Biohemijski parametri i genotipi CYP3A5

Parametar	CYP3A5			p ¹
	0	1	2	
Le	10,43±6,04	11,74±4,40	11,04±5,28	0,290
Ly	3,62±4,13	4,51±3,96	3,53±3,07	0,294
Er	4,62±1,09	4,76±0,53	4,64±0,71	0,843 ²
Tr	278,86±135,28	241,38±84,15	257,04±116,05	0,765
Hgb	131.15±21.26	148.68±31.18	138.88±20.13	0,205
Hct	0.41±0.07	0.44±0.08	0.42±0.06	0.287 ²
CRP	27,72±45,26	70,92±98,63	70,14±103,29	0,231
SE	29,83±26,32	36,57±24,18	24,87±25,22	0,613
Na⁺	138,29±3,97	137,76±2,75	136,97±3,67	0,360 ²
K⁺	4,30±0,61	4,33±0,60	4,54±0,75	0,347 ²
Ph	7,47±0,03	7,44±0,03	7,41±0,05	0,046 ²
pCO2	5,06±1,05	11,93±19,87	5,63±2,49	0,950
pO2	12,14±7,73	13,14±12,82	8,21±2,04	0,715
HCO3	29,58±6,35	24,31±3,16	27,97±8,83	0,461
Be	4,58±6,07	0,56±5,65	2,79±10,35	0,747
sO2	93,48±2,54	88,70±6,80	90,55±5,02	0,313 ²
Ne	7,62±4,28	7,21±3,11	7,56±4,20	0,907
Ly/Ne	0,72±0,76	0,84±0,80	0,68±1,29	0,536

¹Kruskal-Wallis test, ²ANOVA, ³ vs CYP3A5*1, ⁴ vs CYP3A5*1*3, ⁵ vs CYP3A5*3;
 0 – CYP3A5*1, 1 – CYP3A5*1*3, 2 – CYP3A5*3

Rezultati u odnosu na prisustvo alela CYP3A5*3 polimorfizma

CYP3A5*1 alel je bio prisutan kod 41 pacijenta (44,6%)(Grafikon 8).



“neizmenjen” – CYP3A5*3, “izmenjen” – CYP3A5*1

Grafikon 8. Učestalost alela CYP3A5*3*1 polimorfizma

Većina demografskih i kliničkih parametara bila je ujednačena u odnosu na prisustvo funkcionalne i nefunkcionalne forme CYP3A5 polimorfizma, osim prisustva komorbiditeta ($p=0,023$), koji su statistički značajno češći kod pacijenata sa nefunkcionalnim alelom CYP3A5 (88,2% vs 59,1%) (tabela 29).

Tabela 29. Demografske i kliničke karakteristike kod nosilaca CYP3A5*3*1 alela

Parametar	CYP3A5				p ¹
	0		1		
Starost	64,46±9,53		68,04±8,08		0,060 ²
Pol					
Muški	33	82,5	31	62,0	0,058 ³
Ženski	7	17,5	19	38,0	
Pušenje					
Nepušači	3	7,3	5	10,0	0,758 ³
Pušači	26	63,4	28	56,0	
Bivši pušači	12	29,3	17	34,0	
Prisustvo komorbiditeta	13	59,1	45	88,2	0,023 ³
BMI	23,05±7,61		21,89±7,24		0,499
FEV1	1,58±0,81		1,37±0,74		0,150
FEV1%	53,86±22,78		51,87±22,34		0,580
FEV1%≤50	23	56,1	32	62,7	0,665
FVC	2,93±1,23		2,56±1,10		0,133
FVC%	80,31±27,00		75,26±22,22		0,423
CAT	24,98±9,73		25,24±9,28		0,937
Mmrc	2,54±1,12		2,37±1,13		0,504
Broj egzercerbacija	5,43±3,31		5,00±3,50		0,525
Broj hospitalizacija	0,83±1,12		0,90±1,15		0,698

¹Mann-Whitney test, ²t test, ³Hi-kvadrat test; 0 – CYP3A5*1, 1 – CYP3A5*3

Vrednost pH je statistički značajno veća kod pacijenata sa izmenjenim CYP polimorfizmom (p=0,046). Ostali ispitivani parametri opšte biohemije su ujednačeni u odnosu na izmenjeni CYP polimorfizam (Tabela 30).

Tabela 30. Biohemijski parametri kod nosilaca različitih alela CYP3A5

Parametar	CYP3A5		p ¹
	0	1	
Le	10,69±5,38	11,04±5,28	0,608
Ly	3,89±3,96	3,53±3,07	0,733
Er	4,68±0,86	4,64±0,71	0,843 ²
Tr	259,67±113,80	257,04±116,05	0,841
Hgb	138,58±26,51	138,88±20,13	0,605
Hct	0,42±0,07	0,42±0,06	0,287 ²
CRP	52,14±84,11	70,14±103,29	0,266
SE	33,79±26,67	34,87±25,22	0,757
Na⁺	137,95±3,42	136,97±3,67	0,360 ²
K⁺	4,31±0,60	4,54±0,75	0,347 ²
Ph	7,45±0,03	7,41±0,05	0,046 ²
pCO2	8,65±14,54	5,63±2,49	1,000
pO2	12,17±10,31	8,21±2,04	0,661
HCO3	25,57±6,05	27,97±8,83	0,519
Be	1,63±6,41	2,79±10,35	0,742
sO2	89,84±6,34	90,55±5,02	0,313 ²
Ne	7,21±3,78	7,56±4,20	0,796
Ly/Ne	0,79±0,78	0,68±1,29	0,649

¹Mann-Whitney test, ²t test; 0 – CYP3A5*1, 1 – CYP3A5*3

5.8. Upoređivanje učestalosti polimorfizama ispitivanih gena između kliničke i kontrolne grupe

Upoređujući kliničku i kontrolnu grupu utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u učestalosti MDR1 heterozigotnog genotipa u kliničkoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,004$). Najčešće je zastupljen MDR1 C3435T u obe grupe (66,7% odnosno 54,4%), zatim sledi MDR1 C3435C (24,4% odnosno 19%). Najmanje zastupljen je MDR1 T3435T u kliničkoj grupi (8,9%) dok je u kontrolnoj grupi njegova učestalost 26,6% (Tabela 31).

Tabela 31. Učestalost MDR polimorfizma u kliničkoj i kontrolnoj grupi

MDR1 C3435T genotipi	Klinička grupa (N=90)		Kontrolna grupa (N=158)	p ¹
	%	%	%	
0	24,4	19,0		0,004
1	66,7	54,4		
2	8,9	26,6		
Ukupno	100,0	100,0		

¹Hi-kvadrat test; 0 – MDR1 3435CC, 1 - MDR1 3435CT, 2 - MDR1 3435TT

Upoređujući kliničku i kontrolnu grupu utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti TNF polimorfizma ($p=0,268$). Najčešće je zastupljen TNF 0 u obe grupe (73,0% odnosno 64,5%), zatim sledi TNF 1 (24,7% odnosno 34,6%). Najmanje zastupljen je TNF 2 (2,2% odnosno 0,9%) (Tabela 32).

Tabela 32 . Učestalost TNF polimorfizma u kliničkoj i kontrolnoj grupi

TNF-alfa GA genotipi	Klinička grupa		Kontrolna grupa		p ¹
	N	%	N	%	
0	65	73,0	69	64,5	0,268
1	22	24,7	37	34,6	
2	2	2,2	1	0,9	
Ukupno	89	100,0	107	100,0	

¹Hi-kvadrat test; TNF-alfa: 0 – (-308)GG, 1 - (-308)GA, 2 - (-308)AA

Upoređujući kliničku i kontrolnu grupu utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u učestalosti CYP3A5 polimorfizma ($p < 0,001$). Najčešće je zastupljen CYP3A5*3 u obe grupe (56,7% odnosno 88,3%). U kliničkoj grupi zatim sledi CYP3A5*1 sa 24,4%, a kod ispitanika kontrolne grupe CYP3A5*3*1 sa 9,7% (Tabela 33).

Tabela 33. Učestalost CYP polimorfizma u kliničkoj i kontrolnoj grupi

CYP	Klinička grupa		Kontrolna grupa		p ¹
	N	%	N	%	
0	22	24,4	2	1,9	<0,001
1	17	18,9	10	9,7	
2	51	56,7	91	88,3	
Ukupno	90	100,0	103	100,0	

¹Hi-kvadrat test; CYP3A5: 0 – *1, 1 - *3*1, 2 - *3

6. DISKUSIJA

Prema podacima GOLD-a, HOBP je trenutno četvrti uzrok mortaliteta na globalnom nivou (1). Najznačajniji faktor rizika za nastanak HOBP je pušenje cigareta, međutim svi pušači ne razvijaju HOBP, tako da precizno razumevanje uticaja ovog faktora na patogenezu HOBP i dalje ostaje nedostupno (6). Naše istraživanje je obuhvatilo 92 pacijenta obolelih od HOBP, prema kriterijumima GOLD-a, koji su imali postbronhodilatatorni odnos FEV1/FVC < 0,7. Brojčano su dominirali muškarci (64%), pušači (59,3%), bivši pušači (31,9%), prosečne životne dobi 66,4± 8,8 godina, što se slaže sa mnogobrojnim kliničkim studijama, s obzirom da je HOBP bolest koja se najčešće i javlja kod muškaraca pušača starije životne dobi (1). Brojna istraživanja su dokumentovala nepovoljan uticaj pušenja cigareta na brzinu opadanja FEV1, tako da su naši rezultati u skladu sa njima (13). Međutim imali smo i 8,8% nepušača, što se može objasniti skorašnjim dokazima da izloženost duvanskom dimu i aerzagadjenju kod nepušača takođe može povećati rizik od nastanka HOBP (14,15,16). Većina naših ispitanika je imalo komorbiditete (78,3%), dok je svega jedna petina ispitanika, 21,7% bila bez pridruženih bolesti. Najčešći komorbiditeti su bili: hipertenzija 66,3%, potom dijabetes mellitus 22,8%, zatim kardiovaskularna oboljenja 19,6 % (ishemijska bolest srca, srčana insuficijencija, poremećaji srčanog ritma, st. post CVD), potom osteoporoza (16,3%), depresivni sindrom (10,9%), reumatoidni artritis (4,3%) i infiltracija na plućima (4,3%), što je u skladu sa samom definicijom HOBP, koja ovu bolest opisuje kao bolest sistemskog karaktera koja je praćena hroničnom sistemskom inflamacijom (1), sa brojnim posledicama na druge organe i tkiva, tj. vanplućnim manifestacijama, te postojanju komorbiditeta (2,3,19). Dobijeni rezultati su vrlo slični rezultatima van Manena i saradnika (226). Navedena oboljenja imaju sličnu patofiziološku inflamatornu osnovu, što je potvrđeno u različitim istraživanjima (11,22), i ide u prilog rezultatima koje smo dobili.

HOBP predstavlja visoko heterogenu i kompleksnu bolest, multisistemskog karaktera, što su zaključili ECLIPSE studije, ali i ostalih studija (1,227,228,229). Upravo iz tog razloga je potreban adekvatan multidimenzionalni sistem kojim će se proceniti ne samo respiratorne promene u organizmu obolelog od HOBP, već i sistemske (1). Plućna funkcija odnosno forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi - FEV1 je vrlo značajna komponenta za određivanje stepena težine HOBP i predstavlja zlatni standard u gradiranju ove bolesti, međutim nije dovoljna

za procenu stepena težine HOBP iz već pomenutih razloga. Stoga se moraju uzeti u obzir simptomi kao što su intolerancija napora, kratak dah, ali i neki drugi subjektivni osjećaji kao što su kašalj, stezanje u grudima, kvalitet sna. Navedeni simptomi se procenjuju na osnovu mMRC-dispneja skale, kojom se određuje stepen težine kratkog daha, dok se pomoću CAT skora procenjuju i drugi prisutni simptomi. U multidimenzionalnom sistemu procene stepena težine HOBP se koriste broj i težina egzacerbacije, kao i komorbiditeti, koje smo koristili u našoj studiji. Britanski institut za kliničke studije (NICE) i ECLIPSE studija su predložili da se isti parametri koriste u proceni stepena težine bolesti bolesnika sa HOBP, čime se omogućava bolja terapija svakog pojedinačnog pacijenta (230,231). Koristeći sve navedene parametre došli smo do zaključka da pacijenti sa nižim vrednostima FEV1 (GOLD 3 i GOLD 4) imaju veće vrednosti mMRC-dispnea skale i CAT. Navedeni rezultat se može opravdati činjenicom da je dispneja simptom koji je perzistentan ali i tokom vremena progresivan (94,95), međutim isto tako je i subjektivan osećaj čija percepcija ne mora uvek i bezuslovno da odgovara težini bolesti (94,95). Takođe, CAT predstavlja značajan indikator zdravstvenog statusa, kao i stepena opstrukcije disajnih puteva, koje se navodi u velikoj Evropskoj studiji Jonesa i saradnika, što ide u prilog našem istraživanju (232).

U našem istraživanju su bile prisutne češće egzacerbacije, što možemo objasniti činjenicom da smo se rukovodili postojećom subklasifikacijom pogoršanja HOBP. Ona je bazirana na korišćenju resursa zdravstvene zaštite, koja je egzacerbacije podelila na blage, umerene i teške. Stepenn težine pogoršanja određen je ne samo na osnovu toga da li su lečeni u kućnim ili bolničkim uslovima, već i na osnovu toga da li su zahtevali medicinsku asistenciju ili ne (111). Obzirom na činjenicu da smo podatke uzimali anamnestički, te da je ova observacija bazirana na podsećanju pacijenata bez mogućnosti provere istih moguće je da dobijene informacije nisu sasvim korektne. Upravo iz tog razloga smo napravili i podelu na pacijente koji su bili hospitalizovani i na one koji nisu, a koja je pokazala da većina pacijenata nije bila hospitalizovana, što se može objasniti zaključcima ECLIPSE studije, koje navode da neki pacijenti i pored nižeg FEV1 ne prijavljuju egzacerbacije (227,228). Istraživanja Donaldsona i saradnika su pokazala da sa progresijom HOBP može doći do učestalijih egzacerbacija (105), što se može videti iz naših rezultata koji su pokazali da su broj egzacerbacija i hospitalizacija značajno veći kod bolesnika sa nižim FEV1.

Osim neospornog značaja pušenja za nastanak HOBP, inflamacija takodje igra značajnu ulogu u patogenezi ove hronične bolesti. Smatra se da inflamacija dominira perifernim disajnim putevima i parenhimu pluća i da je omogućava povećana ekspresija brojnih inflamacijskih proteina, citokina, hemokina, adhezionih molekula, inflamatornih enzima i receptora. Poznato je da se inflamacijski odgovor u tkivu pluća karakteriše povećanjem broja neutrofila, makrofaga i CD8+T limfocita, kao i povećanjem koncentracije proinflamatornih citokina. Aktivacijom neutrofila, dolazi do oslobađanja enzima kao što su elastaze i metaloproteinaze, što u daljem toku može dovesti do razvoja emfizema (233,234,235). U skladu sa tim, neka istraživanja su pokazala da povećan broj neutrofila korelira sa stopom opadanja plućne funkcije, odnosno nižim vrednostima FEV1 (235). Takođe su brojne studije razmatrale odnos neutrofila prema limfocitima (Ne/Ly rate, NLR), odnosno njegovu upotrebljivost kao markera zapaljenskog procesa. Ovaj parameter stoji u korelaciji sa ozbiljnošću bolesti, brojem hospitalizacija kod brojnih oboljenja, kao što su KVS, bubrežnih oboljenja i solidnih tumora (236-243). Uočena je značajna povezanost NLR sa ograničenjem protoka vazduha kroz disajne puteve (FEV1), kao i činjenica da može biti značajan prognostički i nezavisni marker za buduće egzacerbacije kod bolesnika sa HOBP (243). Naime, NLR pokazuje signifikantnu, inverznu vezu sa ograničenjem protoka vazduha kroz disajne puteve (243). Furuate i saradnici su korelisali NLR sa kliničkim parametrima u stabilnoj fazi bolesti HOBP, kao i kada su se nalazili u pogoršanjima, i pronašli značajnu korelaciju sa emfizemom, mMRC-dispneja skalom i indeksom komorbiditeta, čime je potvrđeno da je NLR dobar prediktor budućih egzacerbacija i stepena težine HOBP (244). Vrlo slične rezultate dobili su i Lee i saradnici (245,246), kao neke studije (247,248,249), koje su ukazale na moguću prediktivnu vrednost NLR u toku egzacerbacija, ali i da ovaj odnos može detektovati infekcije koje su trigger za akutna pogoršanja kod HOBP, naročito kod bakterijskih infekcija (250). Naše istraživanje ipak nije pokazalo značajnu vezu sa navedenim kliničkim parametrima, što je najverovatnije posledica relativno malog broja pacijenata u odnosu na gore navedene studije.

Povišena serumska koncentracija CRP-a povezana je sa oslabljenom funkcijom pluća i lošom prognozom pacijenata sa HOBP (251,252). U velikoj Danskoj studiji kod pacijenata sa HOBP nađeni su visoki nivoi leukocita, CRP i fibrinogena sa povećanim rizikom od komorbiditeta, kao što su ishemijska bolest srca, dijabetes melitus, karcinom pluća i pneumonije (252). Slična zapažanja su pokazala i druga istraživanja kod kojih je nađeno da visoki nivoi C- reaktivnog proteina dobro kolerišu sa akutnim pogoršanjima obolelih od HOBP, kao i sa stepenom

ograničenja vazduha kroz disajne puteve, odnosno nižim vrednostima FEV1 (253), što se poklapa sa našim istraživanjem. Takođe se pokazalo da viši nivoi CRP-a tokom pogoršanja bolesti mogu biti nezavisni prediktor težine bolesti (254). Neke studije su potvrdile da povećanje broja leukocita u krvi ukazuje na češće egzacerbacije bolesnika sa HOBP (255,256), što je u skladu sa rezultatima ovog istraživanja. Celli i saradnici su pokazali da povećan broj leukocita u krvi sa sobom nosi povećani rizik od egzacerbacija i mortaliteta (256). Naše istraživanje je pokazalo da je BMI statistički značajno veći kod bolesnika sa retkim egzacerbacijama, takođe su slična zapažanja imali Zhenchao i saradnici u svojoj studiji (257).

Genske varijacije – prisustvo polimorfizama gena koji kodiraju enzimske sisteme koji metabolišu toksine koji dospevaju u respiratorni sistem iz spoljne sredine (“ksenobiotici”) verovatno utiču na osetljivost prema duvanskom dimu. Usled toga se može pretpostaviti da su prisutne genske varijacije najverovatnije dodatni faktor rizika za razvoj HOBP.

U našem istraživanju je u populaciji sa HOBP, najčešća kombinacija ispitivanih polimorfizama bila 1/0/2 (MDR1 3435CT, TNF- α (-308)GG, CYP3A5*3) 33,7% pacijenata, zatim sledi 0/0/0 (MDR1 3435CC, TNF- α (-308)GG, CYP3A5*1) 14,6 % pacijenata, potom 1/1/2 (MDR1 3435CT, TNF- α (-308)GA, CYP3A5*3) 11,2% pacijenata, dok je kombinacija 0/0/2 (MDR1 3435CC, TNF- α (-308)GG, CYP3A5*3) bila najređa, svega 4,5%.

Istraživanja ukazuju da je moguće da sistem P-glikoproteina (eng.P-glycoprotein,P-gp), kodiran MDR-1 genom (eng.Multidrug resistance proteins, MDR), igra ulogu u borbi protiv toksičnog efekta pušenja u otklanjanju toksičnih efekata pušenja i otklanjanju metabolita oksidativnog stresa (7). Fiziološka ekspresija P-gp u tkivima je važna determinanta za detoksikaciju u različitim ćelijama i tkivima (124-127). Literaturni podaci ukazuju na činjenicu da je SNP C3435T koji se nalazi u egzonu 26 MDR1 gena, povezan sa nivoima P-gp i sposobnošću preuzimanaja supstrata (129). Van der Deen i saradnici su dokazali da su pacijenti sa HOBP imali smanjen nivo MDR proteina u njihovom bronhijalnom epitelu, što ukazuje da MDR1 ima zaštitnu ulogu kod oksidativnog stresa (143). Neki autori su otkrili smanjenu ekspresiju i aktivnost P-gp tokom inflamacije (144). U našem istraživanju u populaciji bolesnika sa HOBP, je utvrđeno da pacijenti najčešće imaju MDR1 3435CT, odnosno 66,7%, potom MDR1 3435CC 22,4%, dok je MDR1 3435TT svega 8,9%. Takođe smo utvrdili da je učestalost heterozigotnog oblika MDR1 C3435T veći kod ispitanika sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati su slični

studijama Torua i saradnika, koji su tkđ imali najčešće prisustvo MDR1 3435CT kod bolesnika sa HOBP i koji su zaključili da polimorfizam gena MDR1 gena CT može igrati ulogu u razvoju HOBP (258). Analiza demografskih, kliničkih parametara i BMI u odnosu na MDR1 polimorfizam je pokazala da su svi testirani parametri ujednačeni, osim komorbiditeta. Naime, utvrđeno je najčešće prisustvo komorbiditeta kod pacijenata sa MDR1 3435TT (87,5%) i pacijenata sa MDR1 3435CT (86,7%). Tkđ su rezultati pokazali da je prisustvo komorbiditeta značajno učestalije kod MDR1 3435CT u odnosu na pacijente sa MDR1 3435CC. Obzirom da su komorbiditeti kod HOBP pacijenata verovatno u vezi sa hroničnom, sistemskom inflamacijom u organizmu, a da postoje istraživanja koja povezuju polimorfizam MDR1 3435CT sa nekim hroničnim sistemskim inflamatornim oboljenjima (259), ovaj rezultat se može smatrati značajnim. Interesantan je podatak da su kod nas ispitanici nosioci T alela MDR1 bili češće pušači, slična zapažanja su imale i ostale studije (145).

Skorašnji napredak u oblasti farmakogenomike sugerise povezanost kliničkog ishoda kod upotrebe glukokortikosteroidne, antiinflamatorne terapije sa polimorfizmom jednog nukleotida na poziciji 3435 u egzonu 26 (C3435T) gena MDR1. Markova i saradnici su u svojoj studiji procenjivali efekte MDR1 C3435T genotipa na vremenski zavisne profile ekspresije gena i funkcije MDR1/P gp u mononuklearnim ćelijama u periferne krvi, kod akutne inflamacije koju su eksperimentalno indukovali lipopolisaharidima (LPS) (260). Zaključili su da je C3435T genotip-zavisna down- regulacija podržana povećanjem nivoa mononukleara u perifernoj krvi nakon tretmana sa LPS (ekperimentalno nastala inflamacija) tokom 72 h (260). Naše istraživanje je pokazalo da je broj leukocita značajno veći kod pacijenata sa HOBP koji su nosioci T alela MDR1 3435 polimorfizma, što je u skladu sa predhodno pomenutim, a da je koncentracija leukocita najniža kod nosioca C alela MDR1 3435. Takođe su predhodna istraživanja pokazala da je povećanje mononukleara bilo dominantnije za CC (3435) nego za TT (3435). Dobijeni podaci Markove i saradnika ukazuju na to da bi antiinflamatorna terapija bazirana na kortikosteroidima mogla biti efikasnija za nosioce C3435 alela nego za one koji to nisu. Takođe i naši rezultati mogu biti od značaja u individualnom tretmanu terapije HOBP pacijenata u budućnosti. Tokom istraživanja smo došli do saznanja da se sedimentacija statistički značajno razlikuje u odnosu na MDR1 polimorfizma, t.j. da su najveće vrednosti su imali nosioci T alela, dok su najniže vrednosti imali nosioci C alela MDR1 3435, što se takođe može uzeti u obzir tokom budućeg terapijskog tretmana. Naši rezultati pokazuju da je su najveće vrednosti hemoglobina i

hematokrita imali pacijenti sa MDR1 3435CT, a najniže vrednosti pacijenti sa MDR1 3435 TT, međutim u dostupnoj literaturi nije bilo podataka o tome.

Enzim iz sistema P450 CYP3A5, takođe igra glavnu ulogu u oksidativnim reakcijama biotransformacije egzogenih kancerogena, uključujući duvanski dim, i jedna od glavnih izoformi CYP-a koje su izražene u ljudskim plućima (174). U plućima, CYP3A5 se delimično eksprimira u odnosu na CYP3A4, sa najvećim procentom u bronhiolama i alveolarnim epitelnim ćelijama, bronhijalnim žlezdama i alveolarnim makrofazima (176,177,178).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je kod ispitanika naše kliničke grupe funkcionalna forma alela CYP3A5*1 bila četiri puta češća nego kod ispitanika kontrolne grupe (zdravi ispitanici) (44% prema 10%). Obzirom da su većina naših ispitanika bili pušači ili bivši pušači, a da je poznato da duvanski dim, koji se najčešće okrivljuje za nastanak HOBP, sadrži policiklične aromatične ugljovodonike (PAHs), a koji kada dospeju u organizam budu aktivirani putem sistema enzima citohroma P450 (166,167), dobijeni rezultati su slični rezultatima navedenih studija. Aktivirani PAHs su povezani sa smanjenom funkcijom pluća (168), što takođe ide u prilog našem istraživanju. Rezultati o učestalosti funkcionalne forme CYP3A5 kod naših ispitanika kliničke grupe mogli bi bar delimično biti objašnjenje “toksičnijeg” delovanja duvanskog dima na ove osobe. S druge strane, u našem istraživanju, unutar kliničke grupe, nosioci nefunkcionalne forme CYP3A5*3 imali su daleko češće komorbiditete. Distribucija BMI je ujednačena u odnosu na CYP3A5*3, tkđ nema značajne razlike osnovnih biohemijskih parametara iz krvi bolesnika sa HOBP u odnosu na nosioce CYP3A5, a većina demografskih i kliničkih parametara je bila ujednačena u odnosu na prisustvo funkcionalne i nefunkcionalne forme CYP3A5 polimorfizma. Jedino je vrednost pH krvi je statistički značajno veća kod pacijenata sa CYP3A5*1 u odnosu na CYP3A5*3, u literature za sada nema podataka o njihovoj povezanosti.

Faktor nekroze tumora-alfa (TNF- α) je proinflamatorni citokin koji pripada TNF superporodici citokina. Njegova primarna uloga je regulacija imunskih ćelija, međutim ovaj citokin može da indukuje apoptozu, inflamaciju, da inhibira tumorigenezu i viralnu replikaciju (183,184,185). TNF- α igra veoma značajnu ulogu u mnogim inflamatornim bolestima pluća, kao što su: HOBP, bronhijalna astma, akutno plućno oštećenje (ALI) i akutni respiratorni distress sindrom (ARDS) (193,194). Smatra se da je upravo dim cigareta glavni aktivator makrofaga koji potom proizvode

TNF- α (205). Mnoge studije su ukazale na značajno povišen nivo TNF- α u perifernoj krvi pacijenata obolelih od HOBP, pušača (196). Takođe visoki nivoi su nađeni i u idukovanom sputumu, zatim prilikom biopsije pluća ispitanika sa HOBP, ali i BAL-u kod pacijenata sa HOBP (205-207). U našem istraživanju nismo uočili povezanost parametara plućne funkcije, pušenja cigareta i komorbiditeta sa prisustvom polimorfizama gena za TNF- α . Brojne studije takođe nisu našle vezu između navedenih kliničkih parametara (201). Distribucija genotipa GG, GA i AA-308 TNF- α se nije statistički razlikovala u grupi bolesnika sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika. Ono što je zanimljivo je da smo našli da je TNF- α (wild type) najčešće prisutan kod pacijenata sa BMI koji je niži od 18,5, t.j. kod osoba koje se prema klasifikaciji koju je prihvatila SZO svrstavaju u pothranjene ili neuhranjene. Nekoliko studija je pokazalo da TNF- α ima direktni katabolički efekat na skeletne mišiće, te da uzrokuje gubitak mišića indukcijom sistema ubikvitin-proteasoma sistemom (UPS). TNF- α je odgovoran za povećanje glukoneogeneze, gubitak masnog tkiva i proteolizu, dok uzrokuje smanjenje sinteze proteina, lipida i glikogena. Povezan je sa formiranjem IL-1 i povećava ekspresiju proteina 2 (UCP2) i UCP3 u skeletnim mišićima kod kahektičnih stanja (261). Takođe su pronađeni viši nivoi TNF- α 1031T/C gena polimorfizma kod kahektičnih pacijenata obolelih od tumora vrata i glave (262). U studiji Basyigita i saradnika je proučavana veza između niskog BMI kod pacijenata sa HOBP i nivoa TNF- α u idukovanom sputumu ispitanika, međutim nije utvrđena značajna korelacija (263). Demografski i klinički parametri su statistički ujednačeni u odnosu na prisustvo genotipa TNF- α . Međutim što se biohemijskih parametara u krvi tiče, naši rezultati su pokazali da je broj neutrofila značajno veći kod bolesnika sa TNF- α (-308)GG (TNF- α 0), u odnosu na one sa TNF- α (-308)AA (TNF- α 2). Takođe je utvrđeno da najveće vrednosti trombocita kod naših ispitanika imaju pacijenti sa Wild type TNF- α t.j. (-308)GG odnosno TNF 0, dok najmanje pacijenti sa TNF 2 t.j. (-308)AA, međutim te vrednosti se kreću u referentnim granicama, te se ovaj dobijeni podatak može zanemariti.

Zanimljivo je pomenuti da je vrednost pH periferne krvi naših ispitanika bila značajno veća kod pacijenata sa wild type TNF-alfa genom, što se delimično može objasniti za studijima Tomasa i saradnika koje su pokazale da pH vrednost unutar ćelija vrši selektivno delovanje na efektorske funkcije aktiviranih makrofaga (264). Ispitivani su efekti ekstracelularnog pH na produkciju TNF- α indukovano lipopolisaharidima (LPS) u alveolarnim makrofagima koji su ekstrahovani iz bronhoalveolarnog lavata zečeva. Primećeno je da sa nižim vrednostima pH dolazi do

smanjivanja sadržaja TNF- α u podlozi, a koji dovodi do povećanja citosolnog sadržaja TNF- α . Navedeno istraživanje ukazuje na to da pH ima višestruke efekte na produkciju TNF- α u alveolarnim makrofagima. Ovi zaključci sugerišu da je uloga alveolarnog makrofaga u inflamatornom odgovoru modulirana pomoću pH , što može biti od izuzetnog značaja kod inflamatornih procesa bilo koje etiologije, gde je spoljašnje okruženje kiselo (264).

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata istraživanja koje je bilo predmet ove doktorske disertacije može se zaključiti:

1. Parametri sistemske inflamacije, nivo CRP i broj leukocita statistički značajno negativno koreliraju sa FEV1 kod bolesnika sa HOBP.

2. Broj egzacerbacija i broj hospitalizacija, kao i vrednosti CAT i mMRC, su statistički značajno veći kod bolesnika sa težim stepenom bolesti po GOLD klasifikaciji (GOLD3 i GOLD4).

3. BMI je statistički značajno veći kod bolesnika sa retkim egzacerbacijama, dok su CAT skor i mMRC statistički značajno veći kod bolesnika sa češćim egzacerbacijama.

4. FEV1 i FEV1% su statistički signifikatno veći kod HOBP sa retkim egzacerbacijama. FVC i FVC% su takodje statistički značajno veći kod bolesnika sa retkim egzacerbacijama. Pacijenti sa nižim FEV1 su statistički značajno stariji.

5. Nadjena je statistički značajna razlika u frekvenci CT MDR1 3435 genotipa između zdravih ispitanika i ispitanika kliničke grupe. Učestalost heterozigotnog oblika MDR1 C3435T značajno je češća kod HOBP bolesnika ($p < 0,004$).

6. T alel MDR1 3435 bio je češći kod pušača u odnosu na nepušače.

7. Unutar kliničke grupe, broj leukocita i sedimentacija bili su u statistički značajnoj korelaciji sa prisustvom izmenjenog T alela genskog polimorfizma MDR1 3435.

8. Distribucija genotipa GG, GA i AA-308 TNF- α nije se statistički razlikovala u grupi bolesnika sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.

9. Broj neutrofila bio je statistički značajno veći kod bolesnika sa HOBP GG-308 TNF- α genotipom u odnosu na nosioce A alela ovog genskog polimorfizma (GA i AA-308 TNF- α).

10. Vrednost pH bila je značajno veća kod bolesnika- nosilaca GG-308 TNF- α genotipa u odnosu na nosioce A alela ovog genskog polimorfizma (GA i AA-308 TNF- α).

11. Genotip GG-308 TNF- α najčešći je kod HOBP sa BMI $< 18,5$ i u grupi bolesnika sa BMI 18-24,99.

12. Učestalost CYP3A5*1*3 (heterozigotni oblik i homozigotni oblik) bila je signifikantno veća kod bolesnika sa HOBP u odnosu na zdrave ispitanike (43,3% prema 11,6 %, $p < 0,001$).

13. Komorbiditeti HOBP su statistički značajno češći kod bolesnika sa nefunkcionalnim oblikom CYP3A5*3.

14. Vrednosti pH bile su statistički značajno veće kod bolesnika sa funkcionalnom formom CYP3A5.

Ovo istraživanje pokazalo je da su varijantne forme gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam ksenobiotika – MDR1 C3435T i CYP3A5*3, signifikatno češće prisutne kod bolesnika sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu. Ovakav nalaz može ići u prilog teorijskim prepostavkama o izmenjenom metabolizmu toksičnih supstanci kod bolesnika sa HOBP. S obzirom na etiopatogenezu HOBP i značaj pušenja i aerozagadjenja u nastanku ove bolesti, moguće je da genski status ovih bolesnika delimično doprinosi nastanku i brzini progresije bolesti. Ovi enzimi uključeni su i u metabolizam mnogobrojnih lekova, između ostalog i kortikosteroida, pa se može spekulirati i o eventualnoj modifikaciji delovanja primenjene terapije kod bolesnika sa HOBP u odnosu na genski status. Osim toga, broj leukocita i sedimentacija, stoje u značajnoj korelaciji sa izmenjenim genskim statusom MDR1 C3435T, a komorbiditeti su značajno češći kod bolesnika sa nefunkcionalnim CYP3A5*3. Ova korelacija kliničkih nalaza sa genskim statusom HOBP bolesnika zahteva dalje istraživanje koje bi ispitivanjem većeg broja bolesnika omogućilo rasvetljavanje patogenetske veze. Genski status GA-308 TNF- α bio je u statistički značajnoj vezi sa brojem neutrofila, koji je bio veći kod nosilaca A alela u heterozigotnom i homozigotnom obliku. Ipak, prisustvo A alela -308 TNF- α nije bilo češće kod bolesnika sa HOBP u odnosu na zdrave ispitanike.

Rezultati ovog istraživanja mogu dodatno rasvetliti patogenetske aspekte HOBP, ali imaju značaja i u individualizovanom terapijskom pristupu svakom pojedinačnom obolelom od ove hronične progresivne bolesti.

8. REFERENCE

1. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary diseases (update 2018). GOLD. Available from: <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2018/02/WMS-GOLD-2018-Feb-Final-to-print-v2.pdf>
2. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33(5): 1165-85.
3. Soriano JB, Visick GT, Muellerova H, Payvandi N, Hansell AL. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest* 2005; 128(4): 2009-107.
4. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J* 2008; 32(4): 962-9.
5. Wafaa S. El-Shimy, Ayman S. El-Dib, Hala M. Nagy, Wael Sabry. A study of IL-6, IL-8, and TNF- α as inflammatory markers in COPD patients. *Egyptian Journal of Bronchology* 2014; 8:91-99.
6. Masaki F, et al. Critical role of tumor necrosis factor receptor I in the pathogenesis of pulmonary emphysema in mice. *International Journal of COPD* 2016; 11:1705-1712.
7. Milojković M, Milačić N, Radović J, Ljubisavljević S. MDR1 gene polymorphisms and P-glycoprotein expression in respiratory diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015 sep;159(3):341-346.
8. Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwartz D, Marnett LJ, Guengerich FP. Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res* 1989; 49:6304-6312.
9. Le MN, Orłowski E, Schenker MB, Avignon M, Brochard P, Kauffmann F. Occupational exposure matrices in relation to lung function in the PAARC survey. *Occup Environ Med* 1995; 52:634-643.
10. Yang L, Qiu F, Lu X, Huang D, Ma G, Guo Y, et al. Functional polymorphisms of CHRNA3 predict risks of chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer in Chinese. *PLoS one* 2012;7:e46071.
11. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2009; 33(5).

12. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti AG. Mortality in COPD: Role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006; 28(6): 1245-1257.
13. Lainado-Laborin R. Smoking and Chronic Ostructive Disease (COPD). Parallel Epidemics of the 21st Century. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6 (1): 209-224.
14. Lampercth B, McBurnie MA, Vollmer MM et al. COPD in never smokers: results from the population- based burden of obstructive lung disease study. *Chest* 2011; 139 (4): 752-763.
15. Tantisuwat A, Thaveerattham P. Effects of Smoking on Chest Expansion Lung Function and Respiratory Strenght of Younths. *J Phys Ther Sci* 2014; 26(2): 167-170.
16. Hariri A, Wan Mansor MM. Effects of Cigarette Smoking and Pulmonary Function Among University Students. *MATEC Web Conferences* 2017.
17. El Rhazi K, Nejari C, BenJelloun MC, El Biaze M, Attassi M, Garcia-Larsen V. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Fez, Morocco: results from the BOLD study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2016; 20 (1): 136-141.
18. Karadag F, Kirdor S, Karul AB, Ceylan E. The Value of C-Reactive Protein as a marker of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Internal Medicine* 2008; 19 (2): 104-108.
19. Augusti A, Faner R. Systemic inflammation and comorbidites in Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2012; 9 (2): 43-46.
20. Fletcher C, Petro R, Tinker C, Speizer FE. *The natural History of Chronic Bronchitis and Emphysema*. Oxford , Oxford University Press, 1976.
21. Scirnhhofer L, Lampercht B, Vollmer WM et al. Result the burden of obstructive lung disease (BOLD study) *Chest* 2007; 131:29-36.
22. Kim V, Criner GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *ATS J* 2013; 187: 228-237.
23. Ciba Guest Symposium. Terminology, definition and classifications of chronic pulmonary emphysema and related conditions. *Thorax* 1959; 14: 286-299.
24. The definition of emphysema: report National Heart and Blood Institute. Division of lung Disease, workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 182-185.
25. Pauwels RA, Buist AS, Carverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276.

26. Celli BR, MacNee W, Agusti A et al. Standards for diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Res J* 2004; 23(6): 932-946.
27. Schermer TR, Smeele IJ, Thoonen BP, Laux G, Grootens JG, Boxem TJ, Heijdra ZF, van Weel C. Current clinical guideline definitions of airflow obstruction and COPD overdiagnosis in primary care. *Eur Respir J* 2001; 16(3): 1256-1276.
28. Aaron SD, Tan WC, Bourbeau J, et al. Diagnostic Instability and Reversals of chronic Obstructive Pulmonary Disease Diagnosis in Individuals with Mild to Moderate Airflow Obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 196(3): 306-314.
29. Schermer TR, Robberts B, Crockett AJ, et al. Should the diagnosis of COPD be based on single spirometry test? *NPJ Prim Care Respir Med* 2016; 26: 16059.
30. Schirnhofner L, Lamprecht B, Vollmer WM, et al. COPD prevalence in Salzburg, Austria, : results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. *Chest* 2007; 131(1): 29-36.
31. BOLD. Burden of Obstructive Lung Disease Initiative Webpage, published by Imperial College London. <http://www.boldstudy.org/> (accessed 11 September 2016).
32. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28(3): 523-532.
33. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005; 366(9500): 1875-1881.
34. Adeloye D, Chua S, Lee C, et al. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *Journal of global health* 2015; 5(2): 020415.
35. Global Burden of Disease Study Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385(9963): 117-71.
36. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006; 27(3): 397-412.
37. World Health Organisation. Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/ (accessed 11 September 2016).

38. Quach A, Giovannelli J, Cherot-Kornobis N, et al. Prevalence and underdagnosis of airway obstruction among middle –aged adults in northern France: The ELISABET study 2011-2013. *Respir Med* 2015; 109(12): 1553-1561.
39. Chen W, Thomas J, Sadatsafavi M, FitzGerald JM. Risk of cardiovascular comorbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Respiratory medicine* 2015; 3(8): 631-639.
40. Mannino DM, Higuchi K, Yu TC, et al. Economic burden of COPD in the presence of Comorbidities. *Chest* 2015; 148(1): 131-150.
41. Anesi-maesano I. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease in: *Management of Chronoc Obstructive Pulmonary Disease*, Ed saifakas N.;2007;41-70.
42. Stang P, Lydick E, Silberman C, Kempel A, Keating ET. The prevalence of COPD: using smoking rates to estimate disease frequency in the general population. *Chest*.2000; 117(suppl 2): 345S-359S.
43. Wouters EF. Economic analysis of the Confontintg COPD Survey: an overview of results. *Respir med*. 2003;97(supp C): S3-S14.
44. National Institute for Clinical Excellence (NICE). Chronic obstructive pulmonary disease. *Management of chronic obstructive pulmonary disease in adults in primary and secondary care*.<http://guidancenice.org.uk/CG101/pdf/English> 2010.
45. Jensen HH, Godtfredsen NS, Lange P, Vestbo J. Potential misclassifications of causes of death from COPD. *Eur Respir J* 2006;28(4): 781-785.
46. Hoyert DL, Xu JQ. Deaths: preliminary datafor 2011. *Natl Vital Stat Rep* 2011; 61(6): 1-65.
47. Duong M, Islam S, Rangarajan S, et al. Global differences in lung function by region (PURE): an international, community-based prospective study. *The Lancet Respiratory medicine* 2013; 1(8): 599-609.
48. Schneider A, Gantner L, Maag I, Borst MM, Wensing M, Szecsenyl J. Are ICD-10 codes appropriate for performance assessment in asthma in COPD in general practice? Results of a cross sectional observational study. *BMC Health Serv Res* 2005; 5(1): 11.
49. Cooke CR, Joo MJ, Anderson SM, et al. The validity of using ICD-9 codes and pharmacy records to identify patients with chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Health Serv Res* 2011; 11:37.

50. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-2653.
51. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, et al. Small-airway obstruction in emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2011; 365(17): 1567-1575
52. Ofir D, Laveneziana P, Webb KA, Lam YM, O'Donnell DE. Mechanisms of dyspnea during cycle exercise in symptomatic patients with GOLD stage I chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(6): 622-629.
53. Elbehairy AF, Ciavaglia CE, Webb KA, et al. Pulmonary Gas Abnormalities in Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Implications for Dyspnea and Exercise Intolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(12): 1384-1394.
54. Casaburi R, Maltais F, Porszasz J, et al. Effects of tiotropium on hyperinflation and treadmill exercise tolerance in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the American Thoracic Society* 2014, 11(9): 1351-1361.
55. Allinson JP, Hardy R, Donaldson GC, Shaheen SP, Kuh D, Wedzicha JA. The Presence of Chronic Mucus Hypersecretion across Adult life in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(6): 662-672.
56. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256-1276.
57. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822-826.
58. Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J* 2008; 32(4): 1068-1081.
59. Churg A, Tai H, Coulthard T, Wang R, Wright JL. Cigarette smoke drives smallairway remodeling by induction of growth factors in the airway wall. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(12): 1327-1334.
60. Hogg JS, McDonough JE, Gosselink JV, Hayashi S. What drives the peripheral lung-remodeling process in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(8): 668-672.

61. Zhu J, Majumdar S, Qiu Y, et al. Interleukin-4 and interleukin-5 gene expression and inflammation in the mucus-secreting glands and subepithelial tissue of smokers with chronic bronchitis. Lack of relationship with CD8+ cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2220-2228.
62. Lacoste JY, Bosquet J, Chanez P. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 537-548.
63. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1666-172.
64. Stanescu D, Sanna A, Veriter C, et al. Airway obstruction, chronic expectoration and rapid decline in FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996; 51: 267-271.
65. Washko GR, Hunninghake GM, Fernandez IE et al. Lung volumes and emphysema in smokers with interstitial lung abnormalities. *N Engl J Med* 2011; 364(10): 897-906.
66. Retameles I, Elliot WM, Mechi B, et al. Amplification of inflammation in emphysema and its associations with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 469-473.
67. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138(1): 16-27.
68. Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, et al. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192(4): 438-445.
69. E.F.M. Wouters, A.M.W. J. Schols, B. Celli. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon*, 2006; 38: 224-241.
70. Couillard A, Koechlin C, Cristol JP, Varray A, Prefaut C. Evidence of local exercise-induced systemic oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J* 2002; 20: 1123- 1129.
71. de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammations in COPD. *J Pathol* 2000; 190: 619-626.
72. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 2014; 35(1): 71-86.
73. Polusukhin VV, Richmond BW, Du RH, et al. Secretory IgA Deficiency in Individual Small Airways Is Associated with Persistent Inflammation and Remodeling. *Am Respir Crit Care Med* 2017; 195(8): 1110-1021.

74. Stokley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(5 Pt 2): S49-52.
75. Rennard SI, Wachenfeldt K. Rationale and emerging approaches for targeting lung repair and regeneration in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorax Soc* 2011; 8(4): 368-375.
76. Jonson SR. Untangling the protease web in COPD: metalloproteinases in the silent zone. *Thorax* 2016; 71(2): 105-106.
77. Domej W, Oetl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD-implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2014; 9: 1207-1224.
78. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Jonson M, Vignola AM. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1720-1745.
79. Menezes AM, Hallal PC, Perez-Padilla R, et al. Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America. *Eur Respir J* 2007; 30(6): 1180-1185.
80. Rodriguez-Roisin R, Drakulovic M, Rodriguez DA, Roca J, Barbera JA, Wagner PD. Ventilation-perfusion imbalance and chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the American Thoracic Society* 2014;11(9): 1351-1361.
81. Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *Eur Respir Rev* 2014; 23(133): 350-355.
82. Peinado VI, Pizzaro S, Barbera JA. Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest* 2008; 143(4): 808-814.
83. Wells JM, Washko GR, Han MK, et al. pulmonary arterial enlargement and acute exacerbations of COPD. *N Engl J Med* 2012; 367(10): 913-921.
84. Parker CM, Voduc N, Aaron SD, Webb KA, O'Donnell DE. Physiological changes during symptom recovery from moderate exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2005; 26(3): 420-428.
85. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6891-6903.
86. Ito K, Lim S, Caramori G, et al. A molecular mechanism of actions of theophylline induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8921-8926.

87. Donnelly LE, Jones GE, Newton R, Barnes PJ. The inflammatory action of resvetrol on human airway epithelial cells is not mediated via estrogen or glucocorticoid receptors. *Am J Respir Crit Care* 2003; 165: A614.
88. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*; 22: 672-678.
89. Toews GB. Cytokines and the lung. *Eur Respir J* 2001; 18 (Suppl. 34): 3s-17s.
90. Shujaat A, Minkin R, and Eden E. Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007 Sept; 2(3): 273-282.
91. All A Sovari. Cor pulmonale: Differential Diagnoses & Workup. *Int J Clin Pharmacol Res* 2010; 14(3). 95-100.
92. Qaseem A, Snow V, Shekelle P, et al. Diagnosis and management of stable chronic obstructive pulmonary disease: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 2007; 147(9): 633-638.
93. Low G, Gutman G. Couples' ratings of chronic obstructive pulmonary disease patients' quality of life. *Clin Nurs Res* 2003; 12(1): 28-24.
94. Andenaes R, Moum T, Kalfoss MH, Wahl AK. Changes in health status, psychological distress, and quality of life in COPD patients after hospitalization. *Qual Life Res* 2006; 15(2): 249-257.
95. Kessler R, Patridge MR, Miravittles M, et al. Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. *Eur Respir J* 2011; 37(2): 264-272.
96. Miravittles M, Worth H, Soler Cataluna JJ, et al. Observational study to characterise 24-hour COPD symptoms and their relationship with patient-reported outcomes: results from the ASSESS study. *Respir Res* 2014; 15: 122.
97. Montes de Oca M, Perez-Padilla R, Talamo C, et al. Acute bronchodilator responsiveness in subjects with and without airflow obstruction in five Latin American cities: the PLATINO study. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23(1): 29-35.
98. Gosker HR, Wouters EF, van der Vusse GJ, Schols AM. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(5):1033-1047.
99. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of COPD Assessment Test. *Eur Respir J* 2009; 34(5): 648-654.

100. Fletcher CM. Standardized questionnaire on respiratory symptoms: a statement prepared and approved by the MRC committee on the aetiology of chronic bronchitis. *Br Med J* 1960; 2: 1665.
101. Evensen AE. Management of COPD exacerbations. *Am Fam Physician* 2010; 81(5): 607-613.
102. Solar Cata Luna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman Sanches P, et al. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60: 925-931.
103. Han MK, Quibrera PM, Carretta EE, et al. Frequency of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: an analysis of the SPIROMIX cohort. *The Lancet Respiratory Medicine* 2017; 5(8): 619-626.
104. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executivesummary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 532-555.
105. Donaldson GC, Seemungal TAR, Bhowmik A, et al. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57: 847-852.
106. Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Roman Sanchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2005; 60(11): 925-931.
107. Soriano JB, Lamprecht B, Ramirez AS, et al. mortality prediction in chronic obstructive pulmonary disease comparing the GOLD 2007 and 2011 staging systems: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet Respiratory medicine* 2015; 3(6): 443-450.
108. Goossens LM, Leimer I, Metzdorf N, Becker K, Rutten-van Molken MP. Does the 2013 GOLD classification improve the ability to predict lung function decline, exacerbations and mortality : a post-hoc analysis of the 4-year UPLIFT trial. *BMC Pulm Med* 2014; 14: 163.
109. Kim J, Yoon HI, Oh YM, et al. Lung function decline rates according to GOLD group in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015; 10: 1819-1827.
110. Han MK, Muellerova H, Curran-Everett D, et al. GOLD 2011 disease severity classifications in COPD gene: a prospective cohort study. *The Lancet Respiratory medicine* 2013; 1(1): 43-50.

111. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, et al. Susceptibility to exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1128-1138.
112. Spencer S, Calverley PM, Burge PS, Jones PW. Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD. *Eur Respir J* 2004; 23: 698-702.
113. Jones P, Tabberer M, Chen W-H. Creating scenarios of the impact of COPD assessment test (CAT) scores. *BMC Pulmonary Medicine* 2011; 11: 42.
114. Turnpenny P, Ellard S. *Emerijevi osnovi medicinske genetike*. 13th ed. Jelovac M, editor. Beograd : Data Status; 2009.
115. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*. 2009; 10(4): 241-251.
116. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*. 1998; 8(12): 1229-1231.
117. Wilson and Walker's *Principles and Techniques of Biochemistry*. Cambridge: Cambridge University Press, page 146-147.
118. Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for target therapy. *Br J Haematol* 2009; 146(5): 467-478.
119. Russel PJ. *iGenetics: A molecular approach*. 3rd ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2010.
120. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 genotype – related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25(11): 1391-1400.
121. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochimica Biophysica Acta* 2009; 1794: 860-871.
122. Ieri I. Functional significance of genetic polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet* 2012; 27: 85-105.
- 123 Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in blood- brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 1996; 97: 2517-2524.
124. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter I, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Porst P. Normal viability and

altered pharmacokinetics in mice lacking MDR-1 type (drug –transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4028-4033.

125. Van der Deen M, Timens W, Timmer-Bosscha H, van der Strate BW, Scheper RJ, Postma DS, de Vries EG, Kerstjens HA. Reduced inflammatory response in cigarette smoke exposed Mrp1/Mdr1a/1b deficient mice. *Respir Res* 2007; 8: 49.

126. Brady JM, Cherrington NJ, Hartley DP, Buist SC, Li N, Klassen CD. Tissue distribution and chemical resistance genes in rats. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 838-844.

127. Hendrikse NH, de Vries EG, Eriks-Fluks I, van der Graaf WT, Hospers GA, Willemsen AT, Vaalburg W, Franssen EJ. A new in vivo method to study P-glycoprotein transport in tumors and the blood-brain barrier. *Cancer Res* 1999; 59: 2411-2416.

128. Yamaguchi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Janson PJ, Richardson DR. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem* 2013; 288: 31761-31771.

129. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphism of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473-3478.

130. Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Scwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 169-174.

131. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG. Pharmacokinetics of Membrane Transporters Investigators: Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1(MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 481-494.

132. Tang K, Wong LP, Lee EJ, Chong SS, Lee CG. Genomic evidence for recent positive selection at the human MDR1 gene locus. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 783-797.

133. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 285-307.

134. Kurata Y, Ieri I, Kimura M, Morita T, Irie S, Urae A, Ohdo S, Ohtani H, Sawada Y, Higuchi S and Otsubo K. Role of human MDR1 polymorphisms in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72: 209-219.
135. Hoffmejer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkman U. Functional polymorphisms, of the human multidrugresistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expressions and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473-3478.
136. Bazrashani MR, Poulton KV, Mahmoodi M. A linkage and association analysis study in the multidrug resistance gene 1 (MDR1) in renal patients. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012; 3: 314-320.
137. Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, Schmitz G: Real-time reverse transcriptions – PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 2003; 49: 230-238.
138. Scheffer GL, Pijnenborg AC, Smit EF, Muller M, Postma DS, Timens W, van der Valk P, de EG, Scheper RJ. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. *J Clin Pathol* 2002; 55: 332-339.
139. Lechapt-Zalcman E, Hurbain I, Lacave R, Commo F, Urban T, Antoine M, Milleron B, Bernaudin JF. MDR1-Pgp 170 expression in human bronchus. *Eur Respir J* 1997; 10: 1837-1843.
140. Campbell L, Abulrob AN, Kandalaft LE, Plummer S, Hollins AJ, Gibbs A, Gumbleton M. Constitutive expression of p-glycoprotein in normal lung alveolar epithelium and functionality in primary alveolar epithelial cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 441-452.
141. Izzoti A, Cartiglia C, Longobardi M, Balansky RM, D'agostino F, Lubet RA, De Flora S. Alterations of gene expression in skin and lung of mice exposed to light and cigarette smoke. *FASEB J* 2004; 18: 1559-1561.
142. Papp E, Gadawski I, Cote HC. Longitudinal effects of thymidine analogues on mtDNA, mtRNA and multidrug resistance (MDR-1) induction in cultured cells. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 1048-1052.
143. Israeli D, Ziaei S, Gonin P, Garsia L. A proposal for the psihological significance of mdr1 and Bcrp1/ Abcg2 gene expression in normal tissue regeneration and after cancer therapy. *J Theor Biol* 2005; 232: 41-45.

144. Van der Deen M, Marks H, Willemsse BW, Postma DS, Mueller M, Smit EF, Scheffer GL, Scheper RJ, de Vries EG, Timens W. Diminished expression of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in bronchial epithelium of COPD patients. *Virchows Arch* 2006; 449: 682-688.
145. Dogan OT, Katrancigolu N, Karahan O, sanli GC, Zorlu A, Manduz S. Frequency of MDR-1 C>T gene polymorphism in patients with COPD. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65:1115-1117.
146. Jatinder K Lamba, Yvonne S. Lin, Erin G Schuetz, Kenneth E Thummel. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54: 1271-1294.
147. Fredericks S, Holt DW, MacPhee IA. The pharmacogenetics of immunosuppression for organ transplantation: a route to individualization of drug administration. *Am J Pharmacogenomics* 2003; 3(5): 291-301.
148. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Reeling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thumel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genetic* 2001; 11: 383-391.
149. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 773-779.
150. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT, VandenBraden M. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III3A5 (HLp3). *Mol Pharmacol* 1990; 38: 207-213.
151. Paine MF, Khaligi M, Ficher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, Thummel KE. Characterization of inter- and intra-intestinal differences in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283: 1552-1562.
152. Hakkola J, Raunio H, Perkunen R, Saarikoski S, Vahakangas K, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Pasanen M. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only a limited number of fetal livers. *Biol Neonate* 2001; 80: 193-201.
153. Xiang Q, Li C, Zhao X, Cui YM. The influence of CYP3A5*3 and BCRPC421A genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of in healthy Chinese volunteers. *J Clin Pharm Ther* 2017; 42(3): 345-349.

154. Yosuke S, Tokashi F, Fumikori S, Kuhiro M, Nanako M, Rijota T, Yuhki S, Keiko O, Hiromitsu M, Satoshi K, Hiroki I. CYP3A5 polymorphisms affects the increase in CYP3A activity after living kidney transplantation in patients with and stage renal disease. *Br J Clin Pharmacol* 2015; 80(6): 1421-1428.
155. Billing H, Hocker B, Fictner A, van Dammelombaerts R, Friman S, Jaray J, Vondrak K, Sarvary E, Dello Strolago L, Oellerich M, von Ashen N, Tonshoff B. Single-Nucleotide Polymorphism of CYP3A5 Impacts the Exposure to Tacrolimus in Pediatric Transplant Recipients: A Pharmacokinetic Substudy of the Twist Trial. *Ther Drug Monit* 2017, 39(1): 21-28.
156. Genovefa K, Vana K, Georgia R, Constantinos M, Olga D, Ioannis V, Sophie M, Vassiliki V, Vangelis GM. CYP3A5 genotyping for assessing the efficacy of treatment with simvastatin and atrovastin. *Genet Mol Biol* 2015; 38(2): 121-137.
157. Jiang F, Chen L, Yang YC, Wang XM, Wang RY, Li L, Wen J, Liu GM, Huang WT, Xu L, Wang HY. CYP3A5 Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma by Regulating mTORC2/Akt signaling. *Cancer Res* 2015; 75(7): 1470-1481.
158. Nageswara Rao D, Manjula G, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, Senthil R, Vishnupriya S. Association of CYP3A5*3 polymorphism with development of acute leukemia. *Indian J Hum Genet* 2011; 17(3): 175-178.
159. Wang BS, Liu Z, Xu WX, Sun SL. CYP3A5*3 polymorphism and cancer risk: a meta – analysis and meta- regression. *Tumor Biol* 2013; 34(4): 2357-2366.
160. Chris S, Christopher AR, Bernhard F, Roger G, Flory N, Bryan S, Jessika R, Derek A, Uchida J, Steven L, Chaterine MT, Scherwin, Michael GS, Garold SY, Robert MW. Effect of CYP3A5*3 on Asthma Control among Children Treated with inhaled Beclomethasone. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136(2): 505-507.
161. Takayuki S, Punam P, McDuffie HH, Keigo Yurube, Masayoshi E, Yuichiro U, Sunita G, Yumi F, Kazuko N. Association between cytochrome P450 3A5 polymorphism and lung function in Saskatchewan grain workers. *Pharmacogenetics and Genomics* 2008; 18: 487-493.
162. Sampsonas F, Karkoulias K, Kaparianos A, Spiropoulos K. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease, beyond $\alpha 1$ –antitrypsin deficiency. *Curr Med Chem* 2006; 13:2857-2873.
163. Kleenberger SR, Peden D. Gene-environment interactions in asthma and other respiratory diseases. *Annu Rev Med* 2005; 56: 383-400.

164. Hang J, Zhou W, Wang X, Zhang H, Sun B, Dai H, et al. Macrosomal epoxide hydrolase, endotoxin, and lung function decline in cotton textile workers. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 165-170.
165. Seo T, Pahwa P, McDuffie HH, Shindo J, Goto S, hashimoto M, et al. Association between paraoxonase-1 Q192R polymorphism and the lung function among Saskatchewan grain handlers. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 901-908.
166. Diljit KK, Stig EB, Børge GN. CHRNA and CYP3A5*3 genotype, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in the general population. *Pharmacogenetics and Genomics* 2014; 24: 220-229.
167. Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwartz D, Marnett LJ, Guengerich FP. Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res* 1989; 49: 6304-6312.
168. Le MN, Orłowski E, Schenker MB, Avignon M, Brochard P, Kauffmann F. Occupational exposures estimated by means of job exposure matrices in relation to lung function in the PAARC survey. *Occup Environ Med* 1995; 52: 634-643.
169. Arif E, Vibhuti A, Alam P, Deepak D, Singh B, Athar M, et al. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive disease. *Clin Chim Acta* 2007; 382: 37-42.
170. Minematsu N, Nakamura H, Iwata M, Tateno H, Nakajima T, Takahashi S, et al. Association of CYP2A6 deletion polymorphisms with smoking habit and development of pulmonary emphysema. *Thorax* 2003; 58: 623-628.
171. Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weiner T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet Mol Biol* 2004; 27: 133-138.
172. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 2005; 352: 2211-2221.
173. Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet* 2006; 45: 13-31.
174. Zhang JY, Wang Y, Prakash C. Xenobiotic- metabolizing enzymes in human lung. *Curr Drug Metab* 2006; 7: 939-948.

175. Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol* 2002; 32: 391-411.
176. Raunio H, Hakkola J, Pelkonen O. Regulation of CYP3A genes in the human respiratory tract. *Chem Biol Interact* 2005; 151: 53-62.
177. Anttila S, Hukkanen J, Hakkola J, Stjernvall T, Beaune P, Edwards RJ, et al. Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 242-249.
178. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 2004; 5: 243-272.
179. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 149-173.
180. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A5 promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-391.
181. Lin YS, Dowling AL, Quegley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 162-172.
182. Mace K, Bowman ED, Vautravers P, Shields PG, Harris CC, Pfeifer AM. Characterisation of xenobiotic –metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur J Cancer* 1998; 34: 914-920.
183. Haw TJ, Starkey MR, Nair PM, Pavlidis S, Liu G, Nguyen DH, Hsu AC, Hanish I, et al. A pathogenic role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in chronic obstructive pulmonary disease. *Mucosal Immunology* 2015; 9: 859-872.
184. Starkey M, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand translates neonatal respiratory infection into chronic lung disease. *Mucosal Immunology* 2013; 7: 478-488.
185. Steinwede K, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) exerts therapeutic efficacy for the treatment of pneumococcal pneumonia in mice. *J Exp Med* 2012; 209: 1937-1952.

186. Sheridan JP et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptor for TRAIL. *Science* 1997; 227: 818-821.
187. Cabal-Hiero L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 2012; 24(6): 1297-1305.
188. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Pescon JJ, Slack JL, Wolson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P et al. A metalloproteinase disintegrin releases tumor-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 1997; 385(6618):729-7
189. Walsh G. Cytokines: interleukins and tumor necrosis factor. In Walsh G, editor. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons; 2003. P. 246-253.
190. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; 11(9): 372-377.
191. Gupta S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *J clin Immunol* 2002; 22(4): 185-194.
192. Wajant H, Ofizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death Differ* 2003; 10(1):45-65.
193. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296(5573): 1634-1635.
194. Liu J, Lin A, et al. Role of JNK activation in apoptosis. A double-edged sword. *Cell Res* 2005; 15(1): 36-42.
195. Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, et al. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analysis of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell* 2000; 101(7): 777-787.
196. Mathanraj S, Vysak K, Yuvurajan S, Vikram R. Correlation of serum TNF alpha level with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Inter J Res Med Sci* 2017; 5(8): 3309-3316.
197. Arun KS, Lalit PM, Arun S, Ravi T. A study of oxidative stress, antioxidant status, and TNF- α level in chronic obstructive pulmonary disease. *Nat J of Physiology, Pharmacy & Pharmacology* 2015; 5(2); 105-107.
198. Garcia-Castillo J, Pelegrin P, Mulero V, Meseguer J. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics* 2002; 54(3): 200-207.

199. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha-308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(3): 163-172.
200. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the-308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leuk Biol* 1999; 66(4): 526-566.
201. Basic J, Pavlovic D, Jevtovic-Stoimenov T, Vojinovic J, Susic G, Stojanovic I, et al. Etanercept reduces matrix metalloproteinase-9 level in the children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis and TNF-alpha-308GG genotype. *J Physiol Biochem* 2010; 66(2): 173-180.
202. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumor necrosis factor polymorphism TNF- α -308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 2002; 10 (1):82-85.
203. Li Kam Wa TC, Mansur AH, Britton J, Williams G, Pavord I, Richard K, et al. Association between TNF- α -308 tumor necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(9): 1204-1208.
204. Louis R, Leyder E, Malaise M, Bartsch P, Lois E. Lack of association between adult asthma and the tumor necrosis factor alpha -308 polymorphism gene. *Eur Respir J* 2000; 16(4): 604-608.
205. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3: e442.
206. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 530-534.
207. Mueller R, Chanez P, Campbell AM, Bousquet J, Heusser C, Bullock GR. Different cytokine patterns in bronchial biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Respir Med* 1996; 90: 79-85.
208. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systematic inflammation: asystematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 574-580.
209. Bolton CE, Ionescu AA, Shiels KM, et al. Associated loss of fat-free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1286-1294.

210. Iton T, Nagaya N, Yoshikawa M, et al. Elevated plasma ghrelin level in underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 879-882.
211. Ibrahim EE, Zidan MH. The relation between the inflammatory mediators, quality of life, and classifications of the gold guidelines of COPD patients. *Egypt J Chest* 2001; 60: 117-125.
212. Abd El-Maksoud MD, Samy N, EL Khayyal A, et al. Clinical utility of biomarkers as predictors of lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *N Y Sci J* 2010; 3: 25-32.
213. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano R, et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study. *Respir Res* 2010; 11-63.
214. Juanita HV, Mehmet K, Jan AJ, Niels HC, Wim AB, Mieke AD, Emiel FW. Local and Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1218-1224.
215. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(5 pt 1): 1453-1455.
216. Keatings VM, Collins PD, Scot DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha levels in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(2): 530-534.
217. Gross P, Pfitzer E, Tolker M, Babayak MA, Kaschak M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health* 1965; 11: 50-58.
218. Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005; 250-258.
219. Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28(5): 555-562.
220. Zheng T, Kang MJ, Crothers K, et al. Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol* 2005; 174(12): 8106-8115.
221. Hozumi A, Nishimura Y, Nishimura T, Kotani Y, Yokoyama M. Induction of MMP-9 in normal human bronchial epithelial cells by TNF-alpha via NF-kappa B-mediated pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(6): L1444-L1452.

222. Serandour AL, Loyer P, Garnier D, et al. TNF-alpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005; 41(3): 478-486.
223. Errol MT, Andrew W, Carole LY, Renaud V. Overexpression of Tumor Necrosis Factor- α in the Lungs Alters Immune Response, Matrix Remodeling, and Repair and Maintenance Pathways. *Amer J Pathology* 2012; 180: 1413-1430.
224. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 492-498.
225. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF-alpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006; 7: 125.
226. Van Manen JG, Bindels PJ, Zermans CJ, et al. Prevalence of comorbidity in patients with a chronic airway obstruction and controls over the age of 40. *J Clin Epidemiol* 2001; 54: 287-293.
227. Vestbo J, Anderson W, Coxson HO, Crim HO, Crim C, Dawber F, Edwards L, Hagan G, Knobil K, Lomas DA, MacNee W, et al. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-Points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008; 31: 869-873.
228. Agusti A, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respiratory Research* 2010; 11: 122.
229. Wedzicha JA. The heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2000; 55: 631-632.
230. Halpin D. NICE guidance for COPD. *Thorax* 2004; 59: 181-182.
231. O'Reilly J, Jones MM, Parnam J, Lovibond K, Rudolf M. Management of stable chronic obstructive pulmonary disease in primary and secondary care: summary of updated NICE guidance. *Brit Med J* 2010; 340: c3134.
232. Jones PW, Brusselle G, Dal Negro RW, Ferrer M, Kardos P, Levy ML, et al. Properties of COPD assessment test in a cross-sectional European study. *Eur Respir J* 2011; 38: 29-35.
233. Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5: 478-485.
234. Andelid K, Bake B, Rak S, et al. Myeloperoxidase as a marker of increasing systemic inflammation in smokers without severe airway symptoms. *Respir Med* 2007; 101: 888-895.

235. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, et al. Neutrophil elastase mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med* 2010; 16: 219-223.
236. Williams KA, Labidi-Galy SI, Terry KI, et al. Prognostic significance and predictors of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014; 132: 542-550.
237. Roxburgh CS, McMillian DC. Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol* 2010; 6: 149-163.
238. Kacan T, Babacan NA, Seker M, et al. Could the neutrophil to lymphocyte ratio be a poor prognostic factor for non small cell lung cancer? *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 2089-2094.
239. Paliogiannis P, Scognamiglio F, Bellomo M, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor of thyroid papillary carcinoma. *Act Med Mediterr* 2015; 31: 371-375.
240. Azab B, Bhatt VR, Phookan J, et al. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long- term mortality in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 217-224.
241. Stotz M, Gerger A, Eisner F, et al. increased neutrophil-lymphocyte is a poor prognostic factor in patients with primary operable and inoperable pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013; 109:416-421.
242. Zahorec R. Ratio neutrophil to lymphocyte counts: rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy* 2001; 102: 5-14.
243. Arbel Y, Finkelstein A, Halkin A, et al. Neutrophil/Lymphocyte ratio is related to the severity of coronary artery disease and clinical outcome in patients undergoing angiography. *Atherosclerosis* 2012, 225: 456-460.
244. Furuate R, Ishii T, Motegi T, Hattori K, Kusunoki Y, Gemma A, et al. The neutrophil to lymphocyte ratio is related to disease severity and exacerbation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Intern Med* 2016; 55: 223-229.
245. Taylan M, Demir M, Kaya H, et al. Alterations of the neutrophil ratio during the period of stable and acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Respir J* 2017; 11: 311-317
246. Lee SJ, Lee HR, Lee TW, et al. Usefulness of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease a prospective observational study. *Korean J Intern Med* 2016; 55: 891-898.

247. Kurtipek E, Bekci TT, Kesli R, et al. The role neutrophil to lymphocyte ratio in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *J Pak Med Assoc* 2015; 65: 1283-1287.
248. Bilir B, Altintas N, Aydin M, et al. The predictive role neutrophil to lymphocyte ratio in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Gen Med* 2016; 13: 105-110.
249. In E, Kuluozturk M, Oner O, et al. the importans of neutrophil to lymphocyte ratio in chronic obstructive pulmonary disease. *Turk Thorac J* 2016; 17: 42-46
250. Van der Gejn GM, Van Denker S, Meulemen –van Waning V, et al. Evaluation of new laboratory tests to discriminate bacterial from nonbacterial chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Int J Lab Hematol* 2016; 38: 616-628.
251. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C- reactive protein as a predictor of prognosis chronic obstructive pulmonary disease. *Am Respir Crit care Med* 2007; 175: 250-255.
252. Thomsen M, Dahl M, Lange P, Vestbo J. Nordestgaard BG. Inflammatory biomarkers and comorbidites in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 982-988.
253. Milačić N, Milačić B, Milojković M, Ljubisavljević S, Vodopijić S, Hasanbegović M, Đurović M. Correlation C- Reactive Protein and COPD Severity. *Acta Clin Croat* 2016; 55:41-48.
254. Thomsen M, Ingebrigsten TS, Marott JL, Dahl M, Lange P, Vestbo J, et al. Inflammatory biomarkers and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA* 2013; 309: 2353-2361.
255. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1128-1138.
256. Celli BR, Locantore N, Yates J, Tal-Singer R, et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respire Crit Care Med* 2012; 185: 1065-1072.
257. Wu Z, Yang D, Yan Z, Wu N, Liu Y. Body mass index of patients with chronic obstructive pulmonary disease is associated with pulmonary function and axacerbations: a retrospective real world research. *J Thorac Dis* 2018; 10: 5086-5099.
258. Toru U, Ayada C, Gene O, Turgut S, Turgut G, Bulut I. MDR1 gene C/T polymorphism in COPD: data from Aegean part of Turkey. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7 (10): 3573-3577.

259. Brinar M, Cukovic-Cavka S, Bozina N, Ravic KG, Markos P, Ladic A, Cota M, Krznaric Z, Vucelic B. MDR1 polymorphism are associated with inflammatory bowel disease in a cohort of Croatia IBD patient. *Bio Med Central Gastroenterol* 2013; 13: 57
260. Markova S, Tsutomu N, Toshiyuki S, Hiroo M, Hitoshi U, Noboru O, Katsuhiko O. Genotype-dependent Down-regulation of gene Expression and Function of MDR1 in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells under Acute Inflammation. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21(3): 194-200.
261. Patel HJ, Patel BM. TNF- α and cancer cachexia and clinical implications. *Life Sci* 2017; 170: 56-63.
262. Tomasz P, Radoslaw M, Anna B, Marcin M, Pawel G, Teresa MM. Relationship between TNF- α -1031 T/C gene polymorphism plasma level of TNF- α and risk kaheksia. *J of Cancer Research and Clin Oncology* 2018; 144(8): 1423-1434.
263. Basyigit I, Yildiz F, Yildirim E, Boyaci H, Ilgazli A. Body mass index and serum and sputum TNF- α levels relation in asthma and COPD. *Tuberk Toraks* 2004; 52(3): 256-261.
264. Heming TA, Dave SK, Tuazon DM, Chopra AK, Peterson JW, Bidani A. Effects of extracellular pH on tumour necrosis factor – alpha production by resident alveolar macrophages. *Clin Sci (Lond)* 2001; 101(3): 267-274.

PRILOG 1

mMRC –dispnea skala

Gradus 0- nema dispneje, osim pri intenzivnom fizičkom naporu

Gradus 1- nedostatak daha prilikom hodanja po blagom usponu ili pri brzom hodu

Gradus 2- sporije hoda nego obično zbog osećaja nedostatka vazduha, a ako hoda svojimritmom mora da se zaustavi

Gradus 3- zastaje na svakih sto metara zbog nedostatka vazduha

Gradus 4- zbog nedostatka vazduha ne napušta kuću , nedostatak vazduha pri svlačenju i oblačenju

PRIOLOG 2

Your name:

Today's date:



How is your COPD? Take the COPD Assessment Test™ (CAT)

This questionnaire will help you and your healthcare professional measure the impact COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) is having on your wellbeing and daily life. Your answers, and test score, can be used by you and your healthcare professional to help improve the management of your COPD and get the greatest benefit from treatment.

For each item below, place a mark (X) in the box that best describes you currently. Be sure to only select one response for each question.

Example: I am very happy 0 1 2 3 4 5 I am very sad

		SCORE
I never cough	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I cough all the time
I have no phlegm (mucus) in my chest at all	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	My chest is completely full of phlegm (mucus)
My chest does not feel tight at all	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	My chest feels very tight
When I walk up a hill or one flight of stairs I am not breathless	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	When I walk up a hill or one flight of stairs I am very breathless
I am not limited doing any activities at home	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I am very limited doing activities at home
I am confident leaving my home despite my lung condition	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I am not at all confident leaving my home because of my lung condition
I sleep soundly	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I don't sleep soundly because of my lung condition
I have lots of energy	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	I have no energy at all
		TOTAL SCORE <input type="text"/>

BIOGRAFIJA AUTORA

Nena Milačić rođena je 02.07.1975. godine u Nikšiću, Crna Gora. Osnovnu školu i gimnaziju "Slobodan Škerović" je završila u Podgorici. Upisala je Medicinski Fakultet u Prištini školske 1994/95 godine, nakon čega se 1998. godine premešta na Medicinski fakultet u Nišu, gde je i diplomirala 2002. godine sa prosečnom ocenom 8,78. Nakon toga zasniva radni odnos u Kliničkom Centru Crne Gore (KCCG) u Podgorici, na Klinici za Interne bolesti. Specijalizaciju Interne Medicine je završila 2009. godine na Medicinskom Fakultetu u Nišu, Klinički Centar Niš, a subspecijalizaciju Pulmologije 2016.godine, takođe na Medicinskom Fakultetu u Nišu, Klinički Centar Niš. Trenutno je zaposlena na odeljenju Pulmologije Interne Klinike KCCG, Podgorica. Od 2016 godine je angažovana kao naučni saradnik Medicinskog fakulteta u Podgorici. Autor je i koautor 16 radova, od kojih je prvopotpisani autorski rad na SCI listi pod naslovom "Correlation of C-Reactive Protein and COPD severity".

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

УТИЦАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА ЕНЗИМА УКЉУЧЕНИХ У МЕТАБОЛИЗАМ КСЕНОБИОТИКА НА ПАТОГЕНЕЗУ И КЛИНИЧКИ ТОК ХРОНИЧНЕ ОПСТРУКТИВНЕ БОЛЕСТИ ПЛУЋА

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

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

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

У Нишу, 30.09.2019

Потпис аутора дисертације:



Др Неђа Н. Милачић

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

Наслов дисертације:

**УТИЦАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА ЕНЗИМА УКЉУЧЕНИХ У
МЕТАБОЛИЗАМ КСЕНОБИОТИКА НА ПАТОГЕНЕЗУ И КЛИНИЧКИ ТОК
ХРОНИЧНЕ ОПСТРУКТИВНЕ БОЛЕСТИ ПЛУЋА**

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

У Нишу, 30.08.2019г.

Потпис аутора дисертације:

Нена Милачић

Др Нена Н. Милачић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

УТИЦАЈ ГЕНСКИХ ПОЛИМОРФИЗАМА ЕНЗИМА УКЉУЧЕНИХ У МЕТАБОЛИЗАМ КСЕНОБИОТИКА НА ПАТОГЕНЕЗУ И КЛИНИЧКИ ТОК ХРОНИЧНЕ ОПСТРУКТИВНЕ БОЛЕСТИ ПЛУЋА

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

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

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

У Нишу, 30.08.2019г.

Потпис аутора дисертације:

Др Нена Н. Милачић