

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Ivana D. Stanojković

**POKAZATELJI OKSIDATIVNOG STRESA I
INFLAMACIJE KOD PACIJENATA SA
HRONIČNOM OPSTRUKTIVNOM BOLEŠĆU
PLUĆA I KOMORBIDITETOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Ivana D. Stanojković

**INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS AND
INFLAMMATION IN CHRONIC
OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE
PATIENTS WITH CO-MORBIDITY**

DOCTORAL DISSERTATION

BELGRADE, 2014

Komisija za ocenu i odbranu disertacije:

.....
Prof. dr Slavica Spasić
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

.....
Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

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

Datum odbrane:

IZRAZI ZAHVALNOSTI

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u saradnji sa Klinikom za pulmologiju KCS, pod rukovodstvom prof. dr Slavice Spasić.

Zahvaljujem se mentorki prof. dr Spasić na ukazanom poverenju i podršci tokom izrade disertacije.

Prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević se zahvaljujem za veliko zalaganje i svesrdnu podršku u svim fazama rada, a posebno na savetima onda kada je bilo najteže.

Prof. dr Branislavi Milenković se zahvaljujem na podršci tokom prikupljanja biološkog materijala, korisnim savetima i sugestijama.

Posebna zahvalnost doc. dr Aleksandri Stefanović koja je svojom energijom rad na disertaciji učinila lakšim.

Takođe se zahvaljujem i svim ostalim profesorkama i tehničkom osoblju sa Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici čija mi je podrška i ljubav dala snage da ovakav rad započnem i završim.

POKAZATELJI OKSIDATIVNOG STRESA I INFLAMACIJE KOD PACIJENATA SA HRONIČNOM OPSTRUKTIVNOM BOLEŠĆU PLUĆA I KOMORBIDITETOM

REZIME

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je hronična inflamatorna bolest koja zahvata gornje i donje disajne puteve, parenhim pluća i plućnu vaskulaturu. Procenjuje se da u našoj zemlji od hronične opstruktivne bolesti boluje između 400 000 i 600 000 ljudi. U svetu je više od 600 miliona obolelih od ove bolesti, sa blizu 3 miliona smrtnih slučajeva godišnje, čineći je petim uzročnikom smrtnosti u ljudskoj populaciji. Procenjuje se da će u budućnosti broj obolelih rasti i do 2020. godine biti treći uzročnik smrtnosti.

Ranijih godina je definicaja hronične opstruktivne bolesti pluća bila bazirana na plućnoj patologiji, tj. na progresivnoj opstrukciji disajnih puteva. Smatralo se da je promenjeni inflamatorni odgovor pluća na inhalirane toksične partikule i gasove iz duvanskog dima, aerozagađenja i ostalih zagađivača glavni mehanizam u patogenezi ove bolesti. Međutim, poslednja istraživanja ukazuju na složen mehanizam nastanka i razvoja ove bolesti, koji pored pojačane inflamacije uključuje i izražen oksidativni stres i pojačanu proteolizu ekstracelularnog matriksa (ECM), a kao posledica disbalansa proteaza/antiproteaza sistema.

Hroničnu opstruktivnu bolest pluća karakterišu i stanja egzacerbacije bolesti. Egzacerbacija HOBP definiše se pogoršanjem respiratornih simptoma u odnosu na predhodne dnevne varijacije, koje zahtevaju promenu u tretmanu lekovima. Učestalost ovog stanja određuje težinu i ishod HOBP.

Bitna karakteristika HOBP je i veliki broj komorbiteta, nastalih u najvećem broju slučajevima kao posledica delovanja upravo pojačane inflamacije, oksidativnog stresa i proteolize ECM. Među ovim bolestima najzastupljenije su bolesti kardiovaskularnog sistema, osteoporoza, disfunkcija skeletnih mišića, depresija.

Cilj ove studije bio je ispitivanje prisustva hronične inflamacije, oksidativnog stresa i proteolize ekstracelularnog matriksa, nastale kao posledica disbalansa proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa HOBP i povezanosti parametara ovih procesa sa razvojem komorbiditeta. U ovoj studiji su kao komorbiditeti ispitivani osteoporoza i ishemijska bolest srca (IBS).

U istraživanju je učestvovalo 210 pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća i kontrolna grupa od 47 osoba bez klinički evidentiranih bolesti. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinkškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Farmaceutskog fakulteta i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da pacijenti sa HOBP nalaze u stanju pojačane inflamacije, oksidativnog stresa i disbalansa proteaza/antiproteaza sistema. Egzacerbacija bolesti sa sobom donosi pojačanje svih navedenih patoloških karakteristika ove bolesti. Pogoršana respiratorna funkcija, izražena kroz odnos forsiranog ekspirijumskog volumena u prvoj sekundi i forsiranog vitalnog kapaciteta pluća (FEV_1/FVC) izraženog u procentima, u stanju egzacerbacije u negativnoj je korelaciji sa koncentracijom superoksidnog jona, glavnog uzročnika oksidativnog stresa ($r = -0,277$, $p < 0,01$). Takođe je dokazana i pozitivna korelacija između koncentracija C-reaktivnog proteina i prooksidativno-antioksidativnog balansa ($r = 0,238$, $p < 0,05$), povezujući procese pojačane inflamacije i oksidativnog stresa. Pozitivna korelacija takođe postoji i između koncentracije AOPP i parametara proteaza/antiproteaza sistema, matriks metaloproteinaze-9 (MMP9) ($r = 0,292$, $p < 0,01$), tkivnog inhibitora metaloproteinaza 1 (TIMP1) ($r = 0,372$, $p < 0,01$) i kompleksa MMP9-TIMP1 ($r = 0,309$, $p < 0,01$), koji pak povezuje oksidativni stres sa proteolizom ECM. Ova veza potvrđena je i pozitivnom korelacijom između nivoa ukupnog oksidativnog statusa (TOS) i koncentracija MMP9 ($r = 0,230$, $p < 0,05$) i njenog tkivnog inhibitora (TIMP1) ($r = 0,243$, $p < 0,05$).

Rizik od nastanka osteoporoze kod HOBP pacijenata ispitivan je merenjem koncentracije proizvoda resorpcije koštanog tkiva, C-terminalnog proteina kolagena tipa 1, tj. "beta cross-laps" (beta CL). Rezultati ispitivanja ukazali su na povećanu koncentraciju beta CL kod pacijenata sa HOBP u odnosu na zdrave u stabilnom ($0,408$ ng/ml vs. $0,362$ ng/ml, $p < 0,01$) i stanju egzacerbacije ($0,521$ ng/ml vs. $0,362$ ng/ml, $p < 0,001$), kao i značajno povećanje u stanju egzacerbacije u odnosu na stabilno stanje ($p < 0,01$). Multipla regresiona analiza pokazala je da

58,1% varijabilnosti u koncentraciji beta CL posledica interakcije respiratorne disfunkcije i hipoksije (sniženog parcijalnog arterijskog pritiska kiseonika, Pa_{O_2}), inflamacije (povećan procenat neutrofila u cirkulaciji), oksidativnog stresa (povećani nivo TOS i snižena aktivnost paraoksonaze 1) i proteaza/antiproteaza sistema (povišene koncentracije TIMP1).

Prisustvo IBS kod pacijenata uključenih u ovu studiju dijagnostikovano je kod 36 pacijenata od 60 pacijenata ordiniranih u stabilnom stanju. Rezultati ispitivanja su ukazali na pojačanu inflamaciju, oksidativni stres i disbalans proteaza/antiproteaza sistema kod HOBP pacijenata sa IBS u odnosu na HOBP pacijente bez IBS. Statistički najznačajnija je razlika u koncentraciji TIMP1 (207 ± 18 ng/ml vs. 142 ± 17 ng/ml, $p=0,009$). Koncentracija TIMP1 u pozitivnoj je korelaciji sa TOS ($\rho=0,501$, $p<0,05$) i procentom neutrofila ($\rho=0,806$, $p<0,05$) i u negativnoj korelaciji sa Pa_{O_2} ($\rho= -0,868$, $p<0,05$). Logističkom regresionom analizom dokazano je da TIMP1 ima najbolju prediktorsku moć (OR=1,023, $p=0,007$), koja se zadržava i nakon modifikacije za godine, pol i pušenje. Takođe TIMP1 ima i najbolju moć razdvajanja IBS+ od IBS- kod HOBP pacijenat (AUC 0,812).

Generalno, rezultati ove studije ukazuju da HOBP i komorbiditeti u svom razvoju uključuju zajedničke patološke procese: inflamacija, oksidativni stres i disbalans proteaza/antiproteaza sistema. Osteoporoza kod HOBP nastala kao posledica pojačane resorpcija koštanog tkiva direktna je posledica ovih procesa. Takođe je dokazan potencijal parametra proteaza/antiproteaza sistema, TIMP1 kao faktora rizika u razvoju IBS kod HOBP pacijenata. Dalja ispitivanja na većem broju ispitanika mogla bi doprineti da se ovi parametri uvrste među obavezne u procesu praćenja HOBP pacijenata a u cilju sprečava razvoja ovih komorbiditeta.

Ključne reči: hronična opstruktivna bolest pluća, oksidativni stres, proteaza/antiproteaza sistem, komorbiditeti

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 616.24-007.63 : [546.21 : 544.452.14] (043.3)

INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE PATIENTS WITH CO-MORBIDITY

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic inflammatory disease involving the upper and lower airways, lung parenchyma and lungs vasculature. It is estimated that in our country 400 000 to 600 000 people with chronic obstructive pulmonary disease. There are more than 600 million COPD patients worldwide, and with close to 3 million lethal cases per year, COPD is the fifth cause of mortality in human population. It is estimated that the number of these patients will rise in future, and by 2010 the disease will become the third cause of mortality.

In previous years the definition of chronic obstructive pulmonary disease was based on pulmonary pathology, i.e. progressive obstruction of airways. It was considered that an altered inflammatory pulmonary response to the inhaled toxic particles and gases from tobacco smoke, air pollution and other pollutants was the main mechanism of the pathogenesis of this disease. However, the latest investigations have shown a complex mechanism of occurrence and development of this disease, which besides an increased inflammation also includes an increased oxidative stress and intensified proteolysis of the extracellular matrix (ECM), as a consequence of disbalance of the protease/antiprotease system.

Chronic obstructive pulmonary disease is also characterized by the states of exacerbation of disease. Exacerbation of COPD is defined as deterioration of respiratory symptoms in relation to the previous daily variations, requiring a change in medical treatment. The frequency of this state determines the severity and outcome of the COPD.

An essential characteristic of COPD is also a large number of comorbidity, in majority of cases occurred as a consequence of an increased inflammation, oxidative stress and proteolysis of

ECM. The most frequent among these diseases are cardiovascular system disease, osteoporosis, dysfunction of skeletal muscles, depression.

The aim of this study was an investigation of chronic inflammation, oxidative stress and proteolysis of extracellular matrix, occurred as a consequence of disbalance of protease/antiprotease system in the COPD patients and the correlation of these processes with the development of comorbidity. In this study the osteoporosis and the ischemic heart disease (IHD) were investigated as comorbidities.

The investigation included 210 patients with chronic obstructive pulmonary disease and a control group of 47 persons without clinically recorded diseases. The study was planned in accordance with the ethical standards of the Helsinki declaration (revised version from 1983) and in accordance with the regulations of the Ethical committee of the Faculty of Pharmacy and Faculty of Medicine, the University of Belgrade.

The results of this investigation have shown that the patients with COPD have an increased inflammation, oxidative stress and disbalance of protease/antiprotease system. Exacerbations leads to amplification of all the mentioned pathological characteristics of disease. An impaired respiratory function, expressed as ratio of forced expiratory volume in the first second and forced vital capacity of lungs (FEV1/FVC) expressed in percent, in the state of exacerbation is in a negative correlation with the concentration of superoxide anion, the main cause of oxidative stress ($r = -0,277$, $p < 0,01$). The positive correlation between the C-reactive protein concentration and the prooxidative-antioxidative balance ($r = 0,238$, $p < 0,05$), linked the processes of increased inflammation and oxidative stress. The positive correlation between advanced oxidation protein products (AOPP) and the parameters of protease/antiprotease system, matrix metalloproteinase-9 (MMP9) ($r = 0,292$, $p < 0,01$), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) ($r = 0,372$, $p < 0,01$) and complex MMP9-TIMP1 ($r = 0,309$, $p < 0,01$), links an oxidative stress and proteolysis of ECM. This relation has been confirmed by a positive correlation between the level of total oxidative status (TOS) and concentration of MMP9 ($r = 0,230$, $p < 0,05$) and its tissue inhibitor (TIMP1) ($r = 0,243$, $p < 0,05$).

A risk of osteoporosis occurrence in COPD patients was investigated by measuring the concentrations of products of the reabsorption of bone tissue, C-end terminal protein collagen

type 1 i.e. "Beta-Crosslaps" (beta CL). The results of the investigation have shown an increased concentration of beta CL in the COPD patients compared to healthy subjects, stable state (0,408 ng/ml vs. 0,362 ng/ml, $p < 0,01$) and state of exacerbation (0,521 ng/ml vs. 0,362 ng/ml, $p < 0,001$), as well as a significant increase in the state of exacerbation compared to the stable state ($p < 0,01$). The multiple regression analysis has shown that 58,1% of variability in beta CL concentration was a consequence of interaction of respiratory dysfunction and hypoxia (decreased partial arterial pressure of oxygen, Pa_{O_2}), inflammation (increased percentage of neutrophils in circulation), oxidative stress (increased TOS level and decreased activity of paraoxonase 1) and protease/antiprotease system (increased concentrations of TIMP1).

The presence of IHD in the patients involved in this study was diagnosed in 36 patients, out of 60 patients ordained in a stable state. The results of investigation have shown an increased inflammation, oxidative stress and disbalance of protease/antiprotease system in the COPD patients with IHD compared to the COPD patients without IHD. The most significant statistical difference was found in the concentration of TIMP1 (207 ± 18 ng/ml vs. 142 ± 17 ng/ml, $p = 0,009$). The concentration of TIMP1 is in a positive correlation with TOS ($r = 0,501$, $p < 0,05$) and the percentage of neutrophils ($r = 0,806$, $p < 0,05$) and in negative correlation with Pa_{O_2} ($r = -0,868$, $p < 0,05$). Using a logistic regression analysis it was proven that TIMP1 had the highest predictive ability (OR=1,023, $p = 0,007$), which also remains after the modifications related to age, gender and smoking habits. The TIMP-1 provided high percent correctly classified patients (94.1%) consistent with previously diagnosed IHD in COPD patients (AUC 0,812).

In general, the results of this study show that COPD and comorbidities in their development include mutual pathological processes: inflammation, oxidative stress and disbalance of protease/antiprotease system. The osteoporosis in COPD, occurred as a consequence of an increased resorption of the bone tissue, is a direct consequence of these processes. The study was indicated on the potential of the parameter protease/antiprotease system, TIMP1 as a risk factor in the development of IHD in COPD patients. The further investigations of larger number of examinees, could make a contribution for those parameters (beta CL and TIMP1) to be included into obligatory ones in monitoring of the COPD patients, with a purpose to prevent the development of these comorbidities.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, oxidative stress, protease/antiprotease system, comorbidity

Scientific field: Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC number: 616.24-007.63 : [546.21 : 544.452.14] (043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Patogeneza hronične opstruktivne bolesti pluća.....	2
1.1.1. Uloga inflamacije u patogenezi HOBP.....	3
1.1.2. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi HOBP.....	4
1.1.3. Uloga proteaza/antiproteaza sistema u patogenezi HOBP.....	8
1.2. Komorbiditeti kod HOBP.....	10
1.2.1. Osteoporoza.....	10
1.2.2. Ishemijska boldest srca.....	12
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
2.1. Oksidativni stres, inflamacija i disbalans proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća	15
2.2. Komorbiditeti kod hronične opstruktivne bolesti pluća.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Ispitanici.....	17
3.2. Antropometrijska merenja.....	19
3.3. Parametri respiratorne funkcije.....	19
3.4. Parametri inflamacije.....	19
3.5. Određivanje parametara oksidativnog statusa.....	19
3.3.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa.....	20
3.3.2. Određivanje parametara antioksidativne zaštite.....	21

3.6. Parametri lipidnog statusa.....	22
3.7. Parametri proteaza/antiproteaza sistema.....	23
3.8. Marker resorpcije kostiju.....	23
3.9. Statistička analiza.....	23
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	25
4.1. Osnovni demografski podaci za pacijente sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća i kontrolnu grupu.....	25
4.2. Ispitivanje respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema kod HOBP pacijenata.....	26
4.2.1. Parametri respiratorne funkcije kod HOBP pacijenata.....	27
4.2.2. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod HOBP pacijenata i u kontrolnoj grupi.....	29
4.2.3. Parametri inflamacije kod HOBP pacijenata i u kontrolnoj grupi.....	32
4.2.4. Parametri proteaza/antiproteaza sistema kod HOBP pacijenata i kontrolnoj grupi.....	34
4.2.5. Korelacija između ispitivanih parametara.....	36
4.3. Ispitivanje resorpcije koštanog tkiva kod HOBP.....	40
4.3.1. Ispitivanje promene u koncentraciji beta-CL kod HOBP pacijenata.....	41
4.3.2. Korelacija koncentracija beta-CL sa parametrima respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema	42
4.4. Ispitivanje respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteza/antiproteza sistema kod HOBP pacijenata u zavisnosti od prisustva ishemijske bolesti srca (IBS).....	45
4.4.1. Parametri respiratorne funkcije kod pacijenata sa i bez IBS.....	46
4.4.2. Parametri oksidativnostresnog statusa kod pacijenata sa i bez IBS.....	46

4.4.3. Parametri inflamacije kod pacijenata sa i bez IBS.....	47
4.4.4. Parametri proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa i bez IBS.....	48
4.4.5. Lipidni status kod pacijenata sa i bez IBS	48
4.5. Korelacija parametara respiratorne funkcije, inflamacije, oksidativnostresnog statusa i lipidnog statusa sa TIMP1 kao faktora rizika za razvoj IBS.....	49
4.6. Logistička regresiona analiza uticaja ispitivanih parametara na razvoj IBS kod HOBP pacijenata.....	51
4.7. Analiza uticaja parametara respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa i inflamacije na prediktivnu moć TIMP1.....	60
5. DISKUSIJA.....	62
5.1. Promena resorpcije koštanog tkiva kod HOBP pacijenata.....	67
5.2. Ishemijska bolest srca kod HOBP.....	69
5.2.1. TIMP1 kao potencijalno novi faktor rizika za razvoj IBS u populaciji pacijenata sa HOBP.....	74
6. ZAKLJUČCI.....	76
6.1. Oksidativnostresni status, inflamacija, proteaza/antiproteaza sistem i njihova korelacija sa kliničkoim stanjem pacijenata.....	76
6.2. Zaključci o promeni resorpcije koštanog tkiva u stanju egzacerbacije.....	77
6.3. Zaključci o uticaju prisustva IBS na parametre oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema.....	78
6.4. Opšti zaključci.....	79
7. LITERATURA.....	80

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

ANOVA	analiza varijanse
AOPP	advanced oxidation protein products, produkti uznapredovale oksidacije proteina
Apo A ₁	apolipoprotein A ₁
Apo B	apolipoprotein B
α ₁ -AT	alfa ₁ -antitripsin
AUC	area under curve, površina ispod krive
Beta-CL	beta-cross laps
DTNB	dinitro-ditio-benzojeva kiselina
ECM	ekstracelularni matriks
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FEV ₁	ekspiriumski volumen ostvaren u prvoj sekundi
FVC	forsirani vitalni kapacitet
GOLD	Global strategy for diagnosis , management and prevention of COPD
H ₂ O ₂	vodonik-peroksid
HDL	high density lipoprotein, lipoprotein velike gustine
HDL-H	HDL-holesterol
HOBP	hronična opstruktivna bolest pluća
hsCRP	high sensitive C-reactive protein, C-reaktivni protein

IBS	ishemijska boleest srca
IFN	interferon
IL	interleukin
IP	interval pouzdanosti
ITM	indeks telesne mase
KVB	kardiovaskularne boleesti
LDL	low density lipoprotein, lipoprotein male gustine
LDL-H	LDL-holesterol
MDA	malondialehid
MMP	matriks metaloproteinaza
NBT	nitroblutetrazolijum
NE	neutrofilna elastaza
NF- κ B	nuklearni transkripcioni faktor
NO	azot-monoksid, azot (II) oksid
NOS	azotmonoksid sinataza
O ₂ ⁻	superoksidni anjon
OR	odd ratio
Pa ₀₂	arterijski parcijalni pritisak kiseonika
PAB	prooksidativni/antioksidativni balans
POaza	paraoksonaza
PON 1	paraoksonaza 1
ROC	Receiver operating characteristics
ROS	reactive oxygen species, reaktivna kiseonična jedinjenja
SOD	superoksid-dismutaza

TAS	totalni antioksidativni status
TG	trigliceridi
T-H	ukupni holesterol
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteinaza
TMB	tetrametil benzil
TNF- α	tumor nekroza faktor α
TOS	totalni oksidativni status

1. UVOD

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je hronična inflamatorna bolest koja zahvata disajne puteve, parenhim pluća i plućnu vaskulaturu. U svetu je više od 600 miliona obolelih od HOBP, sa blizu 3 miliona smrtnih slučajeva godišnje, čineći je petim uzročnikom smrtnosti u ljudskoj populaciji širom sveta (1). U Srbiji je prevalencija ove bolesti, prema rezultatima istraživanja iz 2007. godine oko 5% u opštoj populaciji (2). HOBP se manifestuje u više kliničkih fenotipova, a najčešći su bronhitis i emfizem pluća. Hronični bronhitis se klinički definiše kao produktivni kašalj tokom većeg broja dana u mesecu, najmanje 3 meseca u godini, u poslednje dve ili više godina. Emfizem pluća nastaje usled destrukcije zida alveola smanjujući vazdušne zapremine distalno od terminalnih bronhiola (3).

HOBP se GOLD (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD) klasifikacijom na osnovu težine bronhoopstrukcije razvrstava u četiri nivoa (4). Kao parametri respiratorne funkcije koriste se forsirani vitalni kapacitet (FVC) i forsirani ekspirijumski volumen ostvaren u prvoj sekundi (FEV_1). Vrednosti FEV_1 i FVC upoređuju se sa normalnim vrednostima predviđenim za određene godine i pol, a izražavaju se u procentima predviđene vrednosti (FEV_1/FVC %). Dijagnoza HOBP postavlja se kod pacijenata kojima je izmereni bronhodilatatorni odnos FEV_1/FVC manji od 0,7 (70%) i FEV_1 manji od 80% od predviđenog. Prema GOLD standardizaciji klasifikacija HOBP pacijenata izvršena je na osnovu vrednosti FEV_1 , kod svih pacijenata kojima je izmereni odnos FEV_1/FVC manji od 70%, na:

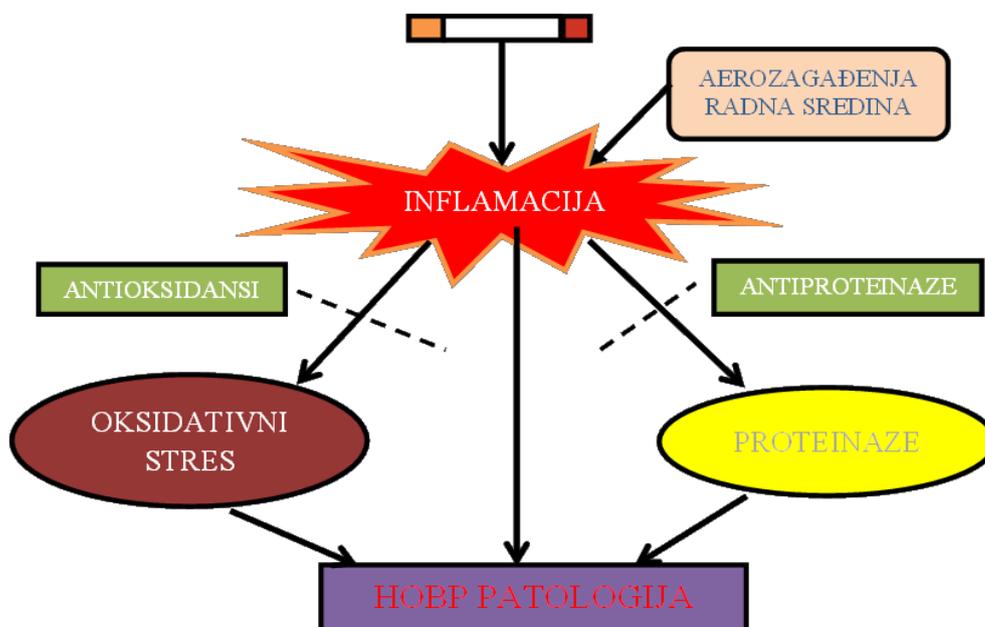
- Nivo 1 – lakši: $FEV_1 \geq 80\%$ od predviđenog,
- Nivo 2 – srednji: $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ od predviđenog,
- Nivo 3 – teški: $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ od predviđenog,
- Nivo 4 – vrlo teški: $FEV_1 < 30\%$ od predviđenog.

HOBP karakterišu i stanja egzacerbacije bolesti. Egzacerbacija se definiše kao pogoršanje respiratornih simptoma, veće u odnosu na prethodne dnevne varijacije, a koje zahteva promenu u tretmanu lekovima. Manji rizik od letalnog ishoda imaju pacijenti čija je frekvencija egzacerbacija manja od 2 puta godišnje. Istovremeno,

pacijenti koji imaju više egzacerbacija (≥ 2 puta u predhodnoj godini) imaju lošiju prognozu (5).

1.1. Patogeneza hronične opstruktivne bolesti pluća

Ranije je definicija HOBP bila bazirana na plućnoj patologiji, tj. progresivnoj opstrukciji disajnih puteva. Naime, smatralo se da je promenjeni inflamatorni odgovor pluća na inhalirane toksične partikule i gasove iz duvanskog dima, aerozagađenja i ostalih zagađivača glavni mehanizam u patogenezi HOBP. Međutim, iako se kod svih pušača i osoba izloženih drugim zagađivačima razvija inflamatorni odgovor u plućima, samo kod određenog broja se razvija i HOBP. Pretstavljanje izmenjenog inflamatornog odgovora kao jedinog uzročnika u razvoju patofizioloških procesa uključenih u destrukciju alveola i remodeliranje disajnih puteva kod HOBP je pojednostavljenje zapravo složenog mehanizma u razvoju ove bolesti (6). Novija istraživanja upravo ukazuju na interakciju brojnih patogenih procesa. Pored izmenjenog inflamatornog odgovora značajnu ulogu imaju i oksidativni stres i pojačana proteoliza ekstracelularnog matriksa (Slika 1) (7).



Slika 1. Najznačajniji činioci u patologiji HOBP

1.1.1. Uloga inflamacije u patogenezi HOBP

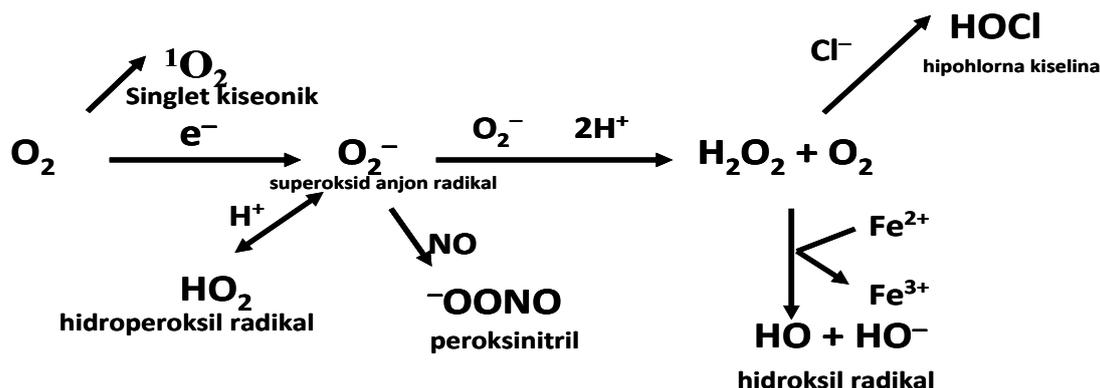
Inhalacija duvanskog dima i čestica aerozagađenja okidač su inflamatornog odgovora u plućima koji se manifestuje prvenstveno influksom nekoliko različitih tipova inflamatornih ćelija. Influksom neutrofila, makrofaga, T-limfocita (pretežno CD8⁺) pokreće se inflamatorni odgovor u plućima. Infiltrirani neutrofili dovode do povećane ekspresije hemokina koji naknadno još više povećavaju infiltraciju leukocita, naročito neutrofila. Tokom egzacerbacija se broj infiltriranih neutrofila naročito povećava (8). Infiltrirani neutrofili istovremeno povećavaju endogenu sintezu IL-8, citokina i hemokina u endotelu disajnih puteva. Takođe je u sputumu pacijenata sa HOBP zabeležen i povećan nivo faktora tumorske nekroze- α (TNF- α) koji utiče na inflamatorni odgovor na više nivoa: stimulušući ekspresiju adhezionih molekula leukocita i epitelnih ćelija i ushodnom-regulacijom drugih proinflamatornih citokina kao što su IL-1 i IL-6 (9). Povećani nivo IL-6 izmeren je u u izdahnutom vazduhu pacijenata sa HOBP i dokazano je da stimulisane bronhijalne epitelne ćelije kod HOBP pacijenata produkuju znatno više IL-6 u odnosu na nestimulisane (10). Povećani broj CD8⁺ T-limfocita pojačava sintezu IFN- γ tako što povećava ekspresiju za hemotaksine i dalju infiltraciju plućnog tkiva aktiviranim T-limfocitima. Istovremeno preko transkripcionog faktora nuklearnog faktora (NF)- κ B dovode do pojačane ekspresije hemokina na glatkim mišićnim ćelijama disajnih puteva, čineći i glatku muskulaturu delom inflamatornog odgovora.

Lokalni inflamatorni odgovor u plućima praćen je i istovremenom sistemskom inflamacijom. Postoji nekoliko teorija o mehanizmu širenja inflamatornog odgovora sa lokalnog na sistemski nivo. Jedan od mogućih mehanizama pretpostavlja da sistemski inflamacija nastaje prelivanjem inflamatornog odgovora iz disajnih puteva i parenhima pluća u sistemsku cirkulaciju, pre svega povećanom permeabilnošću alveolarne kapilarne (11,12). To bi značilo da je sistemski inflamacija u direktnoj korelaciji sa pulmonarnom inflamacijom. Nasuprot tome dokazano je da nema slaganja u broju neutrofila u sputumu sa brojem neutrofila u sistemskoj cirkulaciji ili sistemskim inflamatornim markerima, kao ni korelacije između pulmonarne i sistemske koncentracije inflamatornih citokina (IL-8 i TNF- α) (13,14). Drugo moguće objašnjenje je da patofiziološke promene nastale kao posledica plućne bolesti vode u sistemsku

inflamaciju. To se pre svega odnosi na stanje hipoksije. Kod HOBP pacijenata sa hipoksijom se javlja povećani nivo serumskog IL-6 (15). Takođe je dokazana korelacija između serumskog nivoa TNF- α i stepena hipoksije (16). Povećana aktivnost TNF sistema posledica je aktivacije makrofaga. Cirkulišući neutrofilni kod HOBP pacijenata su funkcionalno promenjeni, sa povećanim hemotaksnim odgovorom, povećanim sposobnostima digestije vezivnog tkiva i povećanim brojem adhezionih molekula na svojoj površini (17). Mogući uzrok promenjene funkcije neutrofila kod ovih pacijenata je njihov povećani sadržaj reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (ROS) (18). Pored citokina u cirkulaciji pacijenata sa HOBP uočen je i povećan nivo proteina akutne faze: CRP i fibrinogena (19,20). Povećani nivo fibrinogena u korelaciji je sa smanjenom plućnom funkcijom i povećava rizik od HOBP, nezavisno od pušenja (21). Povećani nivo proteina akutne faze u sistemske cirkulaciji ukazuju na aktivaciju hepatocita u produkciji ovih proteina, kao i plućnih epitelnih ćelija (22). Sintaza proteina akutne faze snažno je indukovana citokinima kao što su IL-6 i TNF- α , čije su koncentracije povećane i na lokalnom (u plućima) i na sistemskom nivou. Tokom egzacerbacije nivo inflamatornih medijatora znatno je povećan i u plućima i u sistemske cirkulaciji u odnosu na stabilno stanje ove bolesti (21).

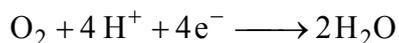
1.1.2. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi HOBP

Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže oksidoredukcionih procesa koji nastaje zbog prekomernog stvaranja slobodnih radikala, koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu. Pod pojmom "slobodni radikal" može se smatrati bilo koji atom, atomska grupa ili molekul koji ima jedan ili više nesparenih elektrona. Slobodni radikali nastaju homolitičkom disocijacijom kovalentne veze, pri čemu po jedan elektron ostaje vezan na svakom atomu (23). Zbog postojanja nesparenog elektrona, slobodni radikali su izuzetno reaktivni, teže sparivanju nesparenog elektrona i time dovode do oštećenja ćelijskih molekula, dezoksiribonukleinskih kiselina (DNK), lipida, proteina i ugljenih hidrata. Stvaranje slobodnih radikala je usko povezano sa aerobnim ćelijskim metabolizmom. Dejstvom jednog slobodnog radikala stvaraju se novi slobodni radikali i pri tome nastaje lančana reakcija koja stvara začarani krug (Slika 2.) (22).

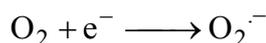


Slika 2. Osnovne reakcije superoksidnog anjon radikala, vodonik peroksida i azot-monoksida prilikom stvaranja novih slobodnih radikala koji vode oštećenju ćelija

Molekul kiseonika predstavlja snažno oksidaciono sredstvo u procesu oksidativne fosforilacije u unutrašnjim membranama mitohondrija tokom oksidacije metabolita do adenzin-trifostata (ATP). Reakcija potpune redukcije kiseonika ima visoki redukcionni potencijal (približno 0.8 V) i zahteva veliku energiju aktivacije:



Ova reakcija koja se normalno dešava u procesu oksidativne fosforilacije u mitohodrijama, postiže se veoma teško i otprilike između 0,4 i 4% molekula kiseonika se delimično redukuje do superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

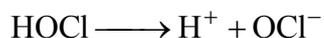
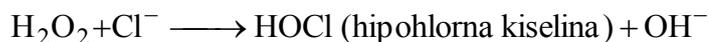


Ovako nastali $\text{O}_2^{\cdot-}$ se normalno uklanja mehanizmima antioksidativne zaštite. U mitohondrijama se prevodi do vodonik peroksida (H_2O_2), dejstvom enzima mitohondrijalne superoksid-dizmutaze (SOD2) (24). H_2O_2 se dalje u mitohondrijama prevodi do molekula vode (H_2O) i O_2 pomoću enzima glutation-peroksidaze (GPx), a ukoliko pređe u citozol, ovu reakciju katalizuje antioksidativni enzim katalaza (CAT) .



U prisustvu jona prelaznih metala (gvožđe, hrom, mangan, plemeniti metali) H_2O_2 stvara vrlo reaktivne slobodne radikale ($\text{HO}\cdot$, HO^-) i ova reakcija je poznata kao "Fentonova reakcija" (Slika 2.) Nastali vodonik-peroksid u prisustvu jona gvožđa i

bakra daje i jako potentan slobodni radikal hipohloritni jon (OCl^-) uz učešće enzima mijeloperoksidaze.



Osim slobodnih kiseonikovih jedinjenja (ROS) izuzetno jak slobodni radikal je i reaktivni slobodni radikal azota, azot-monoksid (NO) (25). Azot-monoksid se normalno stvara u ćelijama vaskularnog sistema u reakciji koju katalizuje enzim endotelijalna azot-monoksid-sintaza (eNOS). U patofiziološkim stanjima, sintetišu se mnogo veće količine NO u reakcijama koje katalizuje enzim inducibilna NOS u makrofagama i glatkim mišićnim ćelijama. NO je bitan medijator endotelijum-zavisne vazodilatacije, inhibira agregaciju trombocita i učestvuje u održavanju rasta i diferencijacije glatko-mišićnih ćelija. Sa O_2^- reaguje jako brzo i stvara visoko reaktivni peroksinitritni anjon (ONOO^-) koji je značajni medijator peroksidacije lipida i nitracije proteina (Slika 2) (25).

Stvaranje velikih količina, ili pak nedovoljno uklanjanje ROS-a rezultira oksidativnim stresom koji može oštetiti biološke makromolekule i dovesti do metaboličkih poremećaja. Međutim, ROS imaju i značajnu ulogu u mnogobrojnim procesima interćelijske signalizacije, proliferacije, apoptoze i imunološkog odgovora. Aktivirane makrofage, monociti, neutrofil i eozinofili mehanizmima fagocitoze mikroorganizama dovode do značajne produkcije ROS-a (26).

Unutar ćelije ROS mogu nastati tokom uobičajenih ćelijskih procesa ili pak mogu biti indukovani određenim egzogenim supstancama. Izvore ROS-a možemo podeliti na endogene (tokom katalitičkih reakcija nikotinamid adenin dinukleotid (NADPH) oksidaze, NADPH-P450 reduktaze, ksantin-oksidaze, SOD, lipoksigenaze, radom makrofaga, leukocita, u respiratornom lancu, delovanjem mikrozomalne hemoksigenaze) i egzogene nastale dejstvom okruženja (UV zračenje, X-zračenje, toksini, upotreba nekih lekova, izloženost kancerogenima).

Pluća su konstantno izložena uticaju oksidanasa, onih koji su endogeno nastali u metaboličkim reakcijama (npr. iz transportnog sistema elektrona u mitohondrijama ili

tokom aktivacije makrofaga), ili egzogenim, kao što su čestice aerozagađenja ili duvanski dim. Zaštitu od oksidanasa u plućima čine razni enzimski i neenzimski antioksidativni sistemi. Kada se balans između oksidanasa i antioksidanasa poremeti, bilo povećanom količinom oksidanasa i/ ili smanjenim kapacitetom antioksidanasa, nastaje oksidativni stres. Posledice oksidativnog stresa ispoljavaju se na nivou pluća, oštećenjem plućnog tkiva ali je istovremeno dokazano i postojanje oksidativnog stresa i u sistemske cirkulaciji (24).

Duvanski dim sadrži oko 10^{15} - 10^{17} molekula oksidanasa u svakom udisaju, što čini pušenje najvećim faktorom rizika za nastanak oksidativnog stresa u plućima i posledičnog razvoja HOBP. Povećani nivo oksidanasa u plućima nastaje i povećanim oslobađanjem ROS iz makrofaga i neutrofila (23). Oksidanti prisutni u dimu cigareta mogu da stimulišu makrofage u alveolama da produkuju ROS i oslobađaju medijatore koji privlače neutrofile i druge inflamatorne ćelije u plućima. Pluća pušača sa opstruktivnim bolestima sadrže veći broj neutrofila nego pluća pušača bez opstruktivskih bolesti. Makrofage i neutrofile u plućima pacijenata sa HOBP sadrže veće koncentracije ROS u odnosu na nepušače i pušače bez HOBP. U sputumu pacijenata sa opstruktivnim bolestima izmerene su povećane koncentracije vodonik-peroksida i superoksidnog anjona (24). Oksidacija proteina, DNA i lipida u plućima i oštećenje plućnog tkiva kao i indukcija različitih ćelijskih odgovora nastavlja da dalje povećava količinu metaboličkih reaktivnih jedinjenja. ROS može izazvati i remodeliranje ECM i krvnih sudova, pojačanu sekreciju mukusa, apoptozu ili proliferaciju ćelija (23). Proizvodi lipidne peroksidacije, čije su koncentracije povećane u sputumu pacijenata sa HOBP, u negativnoj su korelaciji sa FEV₁, ukazujući na uticaj oksidativnog stresa na smanjenje respiratorne funkcije (28). Istovremeno, produkti oksidativnog stresa su signalni molekuli koji pojačavaju inflamaciju u plućima. Ispitivanja makrofaga i alveolarnih i bronhijalnih epitelnih ćelija pokazala su da oksidansi dovode do oslobađanja inflamatornih medijatora, kao što su IL-8, IL-1 i NO, i da je ovakva situacija povezana sa povećanom ekspresijom gena za ove medijatore inflamacije i povećanom aktivacijom NF-κB (29). Vezivanje NF-κB za odgovarajuće mesto u nukleusu dovodi do pojačane transkripcije proinflamatornih gena i samim tim pojačane inflamacije; pojačana inflamacija proizvodi dalji oksidativni stres, pri čemu se stvara začarani krug inflamacije i oksidativnog stresa. Komponente matriksa pluća (kao što je elastin i

kolagen) mogu biti direktno oštećeni pod uticajem oksidanasa iz dima cigareta. Pušenje može da interferira sa sintezom elastina i njegovom reparacijom, dovodeći do proteolitičkog oštećenja matriksa i razvoja emfizema (27).

Antioksidativna zaštita obuhvata enzimsku i neenzimsku grupu antioksidanasa. Glavni enzimski antioksidansi u plućima su katalaza, superoksid-dismutaza (SOD), glutation-S-transferaza, ksantin oksidaza i tioredoksin. Neenzimski odbrambeni antioksidativni sistem čine molekuli male molekulske mase kao što su glutation, askorbat, urat, α -tokoferol, bilirubin i liponska kiselina. Koncentracija ovih molekula varira u zavisnosti od ćelijske i anatomske lokacije. Tako je npr. koncentracija glutationa sto puta veća u sluzi na epitelu disajnih puteva nego u plazmi (30). U plućima, nivo intracelularnih antioksidansa je znatno manji i ne mogu se indukovati oksidativnim stresom, za razliku od ekstracelularnog, koji ima glavnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti (31). Ekstracelularna glutation-peroksidaza je vrlo značajan antioksidans u plućima i mogu je sekretovati epitelne ćelije i makrofage, naročito kao odgovor na duvanski dim i oksidativni stres. Prisustvo ekstracelularne SOD takođe je jako izraženo u plućima, ali njena uloga još uvek nije razjašnjena (32).

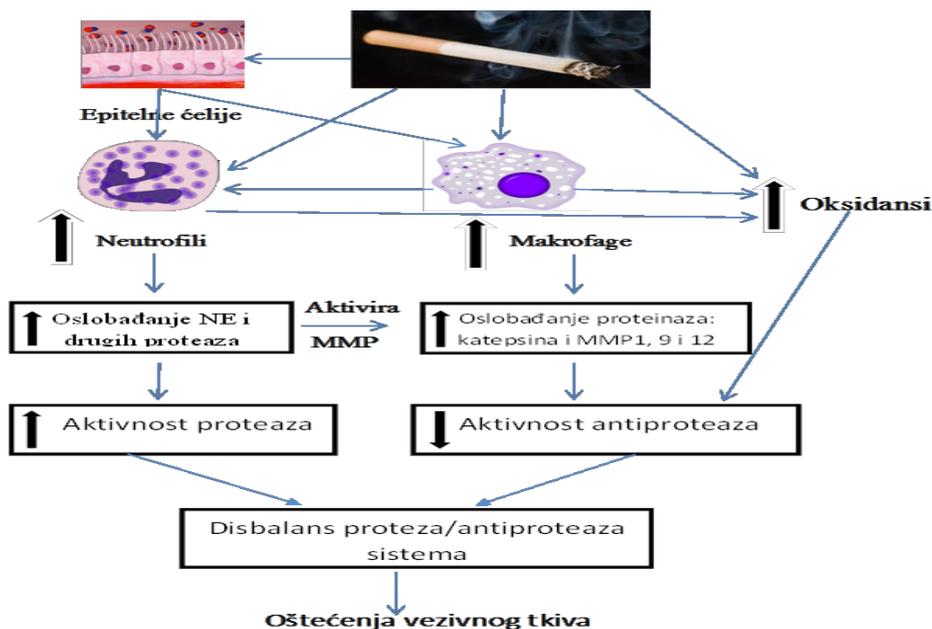
Dokazano je i prisustvo sistemskih markera oksidativnog stresa kod HOBP pacijenata, izmerenih kao biohemjski markeri lipidne peroksidacije, malondialdehida i 8-izoprostana. Koncentracija sistemskih markera oksidativnog stresa naročito se povećava u stanjima egzacerbacije (33).

1.1.3. Uloga proteaza/antiproteaza sistema u patogenezi HOBP

Povećano prisustvo makrofaga i neutrofila u plućnom tkivu pacijenata sa HOBP praćeno je i pojačanim oslobađanjem proteolitičkih enzima iz ovih ćelija. Oslobođene proteaze koje ne budu inhibirane antiproteazama, dovode do oštećenja vezivnog tkiva u plućima (pre svega elastina) i emfizema (34). Neutrofilna elastaza (NE) je vrlo potentan elastolitički enzim i njegovo oslobađanje iz neutrofila dovodi do nastanka emfizema. Ovakav uticaj pojačava deficijencija alfa₁-antitripsina (α_1 -AT), glavnog inhibitora aktivnosti NE. Patogena uloga NE kod emfizema dokazana je i korelacijom između njene povećane koncentracije i težine emfizema (33). Međutim, dokazano je da razvoj emfizema direktno zavisi od broja alveolarnih makrofaga a ne od broja neutrofila (35).

Alveolarne makrofage oslobađaju nekoliko proteinaza: katepsine i matriks metaloproteinaze (MMP). Proteaze neutrofila i makrofaga podržavaju se međusobno tako što aktiviraju jedne druge ili inhibiraju njihove endogene inhibitore; NE inhibira tkivne inhibitore matriks metaloproteinaza (TIMP), dok MMP razgrađuju α_1 -AT. Produkti nastali proteolizom ekstarcelularnog matriksa (ECM), fragmenti elastina i kolagena, imaju hemotaksično dejstvo za prekursore makrofaga i neurofila (36).

Matriks metaloproteinaze su grupa enzima koja obuhvata 25 cink-zavisnih endopeptidaza. Matriks metaloproteinaze u plućima učestvuju u alergijskim inflamacijama, oštećenju i reparaciji tkiva, remodeliranju i odbrani od patogena. Sinteza MMP regulisana je na više nivoa. Proinflamatorni citokini IL-1, IL-6 i TNF- α povećavaju sintezu MMP. Reaktivna kiseonična jedinjenja (superoksidni anjon, hidroksil radikal, hidrogen peroksid) dovode do pojačane ekspresije gena za sintezu MMP. MMP mogu biti slobodne u citozolu ili vezane za površinu ćelija. Kada se nalaze na površini inflamatornih ćelija dodatno pojačavaju inflamatornu funkciju tih ćelija. MMP9 na površini neutrofila kao odgovor na proinflamatorne medijatore može proteolitički razgraditi želatin, kolagen-tip IV, elastin i α_1 -AT (37). Oštećenje pluća izaziva oslobađanje MMP9 i MMP12 iz neutrofila i alveolarnih makrofaga. MMP imaju prirodne inhibitore, a to su grupa jedinjenja označena kao tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (TIMP). Postoje četiri tipa TIMP, a alveolarne makrofage luče TIMP1 i TIMP2. Polimorfne nuklearne ćelije pacijenata sa HOBP sintetišu manje TIMP u odnosu na pušače bez HOBP i nepušače (38). Interakcija faktora koji dovode do neravnoteže između MMPs i TIMPs i oštećenja matriksa tkiva prikazane su na Slici 3.



Slika 3. Šematski prikaz puta nastanka disbalansa proteaza/antiproteaza sistema

1.2. Komorbiditeti kod HOBP

Komorbiditeti se definišu kao bolesti koje koegzistiraju sa primarnom bolešću od interesa. Kada govorimo o komorbiditetima kod HOBP, ovakva definicija postaje problematična s obzirom da su mnoge koegzistirajuće bolesti direktna posledica HOBP, i tu spadaju kardiovaskularne bolesti, osteoporoza, rak pluća, disfunkcija skeletnih mišića, anemija. U daljem tekstu, kao komorbiditeti karakteristični za HOBP biće prikazani ishemijska bolest srca i osteoporoza.

1.2.1. Osteoporoza

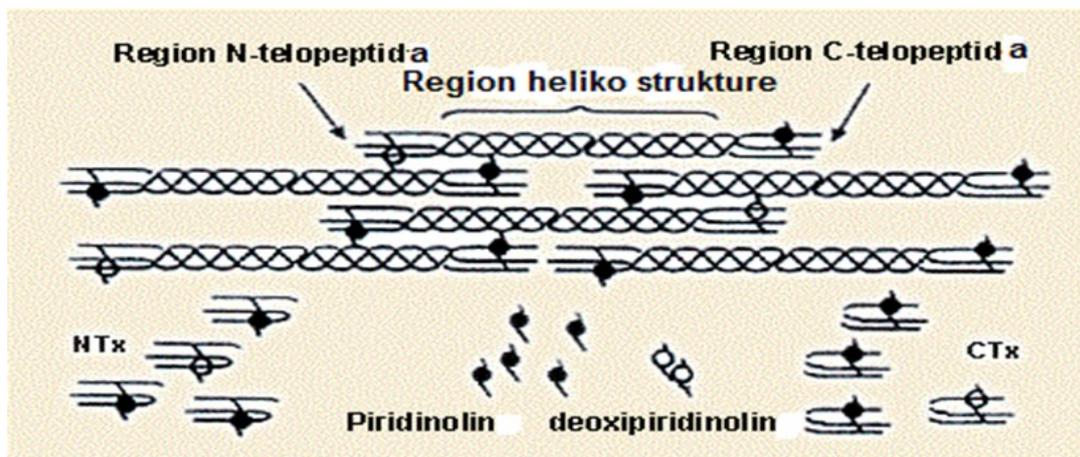
Prevalencija osteoporoze među pacijentima sa HOBP je visoka. Biskobing je objavio da 35-72% pacijenata ima osteopeniju, dok 35-60% osteoporozu (39). Uzrok ovakve pojave može se naći u karakteristikama životnog stila pacijenata sa HOBP: smanjena fizička aktivnost, malnutricija, pušenje, tretman kortikosteroidima i karakteristikama patologije same bolesti (sistemska inflamacija, oksidativni stres, proteoliza). Interesantno je takođe naglasiti da su i emfizem i osteoporoza praćeni gubitkom mase plućnog odnosno koštanog tkiva, i da pri tome izgled osteoporoznih kostiju podseća na

pluća sa emfizemom. Sve ovo navodi na sumnju da ova dva stanja dele zajednički patogenetski mehanizam koji dovodi do progresivnog gubitka tkiva u plućima i kostima ili defektne reparacije ovih tkiva (10).

Sistemska inflamacija može da igra značajnu ulogu u progresiji osteoporoze kod pacijenata sa HOBP. Naime, dokazano je da su povećane koncentracije inflamatornih citokina, IL-6 i TNF- α , povezane sa osteoporozom. Za oba faktora je poznato da stimulišu osteoklaste i povećavaju resorpciju kostiju (40).

Istovremeno sa sistemskom inflamacijom, prisutna neravnoteža u proteaza/antiproteaza sistemu pored uloge u degradaciji plućnog parenhima, ima značajnu ulogu i u resorpciji koštanog tkiva. Čelije koje proizvode znatne količine MMP-9 su čelije respiratornog trakta uključujući bronhijalne epitelne čelije, Clara čelije, zatim limfociti i neutrofilii. Povećani nivo cirkulirajućih MMPs kod pacijenata sa HOBP mogu se dovesti u vezu i sa koštanim metabolizmom kod koga je ravnoteža pomena na stranu pojačane resorpcije. Naime, MMP-9 i MMP-13 imaju značajnu regulatornu ulogu u koštanim metabolizmu. MMP-9 je povezan sa aktivacijom osteoklasta, koji dovode do pojačane resorpcije (41).

Markeri remodeliranja koštanog tkiva koji se koriste u ispitivanjima su podeljeni u dve grupe: 1) markeri formiranja koštanog tkiva (osteokalcin, osteoprotegrin) i 2) markeri resorpcije koštanog tkiva (fragmenti kolagena tipa 1). Kod zdrave populacije koncentracije ovih markera u cirkulaciji su niske. Povećanje koncentracije ovih proteina nedvosmisleno ukazuje na pojačan proces remodeliranja kostiju. Ukoliko je uzrok pojave osteoporoze pojačana resorpcija, nivo fragmenata kolagena tipa 1 značajno se povećava u krvi. Na Slici 4 su prikazani fragmenti kolagena tipa 1 koji se najčešće koriste u analitičkim metodama za merenje nivoa resorpcije kostiju.



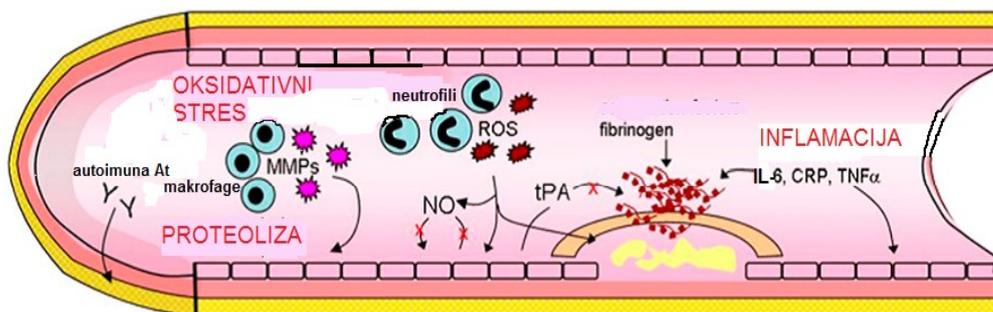
Slika 4. Markeri resorpcije kostiju. NTx - amino terminalni kraj kolagena tipa 1; CTx - karbonalni terminalni kraj kolagena tipa 1

1.2.2. Ishemijska bolest srca

Mnogobrojne studije ukazale su na povećani rizik od kardiovaskularnih bolesti (KVB) kod pacijenata sa HOBP. Naime, svi pacijenti kojima vrednosti FEV₁ snižene u odnosu na referentne, imaju povećani rizik od KVB. U skladu sa ovim, rizik od smrti uzrokovane ishemijskom bolešću srca veći je više od pet puta kod pacijenata sa najnižim vrednostima (prvi kvintil) u odnosu na najviše vrednosti (poslednji kvintil) parametara respiratorne funkcije (42).

HOBP je važan faktor rizika za nastanak ateroskleroze. Patogeneza ateroskleroze je složena i multifaktorijalna. Uloga metabolizma lipida davno je dokazana. Međutim, savremene studije ukazuju na vrlo značajnu ulogu inflamacije u procesu formiranja plaka, njegovog razvoja i rupture. Proces ateroskleroze započinje oštećenjem vaskularnog endotela kao posledica sistemske inflamacije i oksidativnog stresa. Na mestu oštećenja endotelijuma dolazi do ulaska lipoproteina, i to pre svega modifikovanih oksidativnim stresom LDL čestica (oxLDL) (43). Inflamacija i oksidativni stres indukuju produkciju i povećanu ekspresiju adhezionih molekula, kao što su ICAM-1 i VCAM-1 na površini vaskularnog endotela i omogućavaju adheziju leukocita na mestu oštećenja. U ovakvom inflamatornom okruženju i pojačanoj ekspresiji receptora na makrofagama i monocitima koji omogućavaju ingestiju oxLDL

dolazi do formiranja tzv. penastih ćelija. Glatke mišićne ćelije u krvnim sudovima prelaze iz medije u intimu endotela, produkuju ekstracelularni matriks i formiraju fibrinsko-masne lezije na plakau. Ovo na kraju rezultuje fibrozom zida krvnih sudova, koja se nastavlja kalcifikacijom i nastajanjem plaka sa fibroznom kapom koja okružuje lipidima bogato jezgro (43) (Slika 5).



Slika 5. Zajednički mehanizmi formiranja aterosklerotskih plaka i razvoja hronične opstruktivne bolesti pluća.

Sistemska inflamacija karakteristična za HOBP, sa povećanim brojem aktiviranih T-limfocita i makrofaga dovodi i do povećanog oslobađanja citokina i posledične aktivacije endotela. Pored povećane ekspresije adhezionih molekula na površini aktiviranog endotela, citokini kao što su IL-6 i TNF- α mogu olakšati i dalji razvoj plaka. C-reaktivni protein, protein akutne faze nakon dospeća u sistemska cirkulaciju dovodi do pojačane produkcije drugih pro-inflamatornih citikina, aktivacije komplementa i unapređenja digestije LDL čestica od strane makrofaga. Kada plak dostigne određenu zrelost, fibrinska kapa je istanjena a unutrašnji sadržaj bogat inflamatornim ćelijama i lipidima, što dovodi do njegovog pucanja (43).

Istovremeno, aktivirani neutrofil u perifernoj cirkulaciji pacijenata sa HOBP oslobađaju povećane količine ROS, povećavaju ekspresiju adhezionih molekula i dovode do izraženije hemotakse i ekstracelularne proteolize. Naime, cirkulišući monociti pacijenata sa HOBP oslobađaju 2,5 puta veće količine MMP-9 od zdravih, a dokazano je da MMP-9 aktivno učestvuje u patogenezi ateroskleroze i rupturi plaka (44). Oksidativni stres nastao kao posledica pojačanog oslobađanja ROS manifestuje se povećanom količinom proizvoda lipidne peroksidacije. U toku egzacerbacije kada se

oksidativni stres kao i sistemska inflamacija dodatno pojačavaju, stvaraju se uslovi za rupturu aterosklerotskog plaka.

2. CILJEVI ISRAŽIVANJA

2.1. Oksidativni stres, inflamacija i disbalans proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća

Cilj ove doktorske disertacije je bio ispitivanje nivoa parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema u grupi pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća. Praćenje svih ispitivanih parametara vršeno je u tri tačke, tj. tri klinička stanja: u stanju egzacerbacije na prijemu pacijenata na kliničko lečenje, na otpustu sa kliničkog lečenja nakon odgovarajućeg terapijskog tretmana, 7 do 10 dana od prijema i na kontrolnom pregledu kada su pacijenti bili u potpunosti klinički stabilni, prosečno mesec dana od prijema. Cilj studije bio je praćenje promena ispitivanih parametara u odnosu na stanje u kome se pacijenti nalaze, kao i njihov međusobni odnos u tim stanjima. Takođe ispitana je i korelacija parametara oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema sa parametrima respiratorne funkcije, odnosno njihove razlike u odnosu na stadijum bolesti.

2.2. Komorbiditeti kod hronične opstruktivne bolesti pluća

Obzirom da je prisustvo komorbiditeta kod HOBP pacijenata očekivana, cilj naše studije bio je utvrđivanje uticaja promenjenog oksidativnostresnog statusa, hronične inflamacije i disbalansa proteaza/antiproteaza sistema na razvoj osteoporoze i ishemijske bolesti srca, dva najzastupljenija komorbiditeta kod HOBP pacijenata.

Cilj ove studije bio je ispitivanje rizika za razvoj osteoporoze na uzorku ispitanika kroz praćenje promena u resorpciji koštanog tkiva u stanju egzacerbacije u odnosu na stabilno stanje. U daljem toku ispitivanja ispitan je uticaj oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema u stanju egzacerbacije i stabilnom stanju na nivo markera resorpcije koštanog tkiva.

Cilj ove studije bio je i ispitivanje razlike u parametrima oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema, kao i lipidnog statusa kod naših ispitanika u

zavisnosti od prisustva ishemijske bolesti srca, kao komorbiditeta. Sledeći cilj bio je pronalaženja potencijalno novih faktora rizika za razvoj IBS u populaciji pacijenata sa HOBP.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 210 pacijenata sa dijagnozom hronične opstruktivne bolesti pluća. Među pacijentima podjednako su zastupljena oba pola, dok je prosečna starost bila veća od 40 godina. Dijagnoza HOBP postavljena je u skladu sa kriterijumima “Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)” (4). Pacijenti su uključeni u studiju nakon prijema u Kliniku za pulmologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu, u stanju egzacerbacije. Stanje egzacerbacije kategorizovano je u skladu sa kliničkom slikom i standardima lekarske prakse (5). Kriterijumi za isključivanje pacijenata iz studije bili su: dijagnostikovani rak pluća, tuberkuloza, psihička oboljenja, skorija hirurška intervencija ili trauma, upotreba hipoglikemika ili antioksidativnih suplemenata. Pacijenti su zadržani na kliničkom lečenju u proseku 7 do 10 dana, kada je lekarskim pregledom konstatovano da pacijent može nastaviti dalje lečenje u kućnim uslovima. Svim učesnicima istraživanja preporučen je dolazak na kontrolni pregled u roku od 30 dana od dana prijema, u klinički stabilnom stanju. Stabilno stanje definiše se kao stanje bez pogoršanja respiratorne funkcije u trajanju od najmanje 4 nedelje, bez potrebe za promenom terapije i uključivanje kortikosteroida i/ili antibiotika. Od 210 pacijena primljenih u stanju egzacerbacije na kontrolni pregled javilo se 85 pacijenata. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima i Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkih komiteta Farmaceutskog fakulteta i Medicinskog fakulteta u Beogradu. Sve osobe od kojih je uziman biološki materijal koji je kasnije korišćen u istraživanju, potpisale su pristanak za dobrovoljno učešće u studiji i obaveštene su o ciljevima i očekivanim ishodima studije. Demografski podaci, podaci o pušenju, konzumiranju alkohola, fizičkoj aktivnosti, porodičnoj istoriji bolesti, lekovima koje koriste i drugim parametrima uključenim u studiju dobijeni su popunjavanjem upitnika od strane istraživača, putem usmenog intervjua sa ispitanicima. Na osnovu statusa pušenja pacijenti su podeljeni u tri grupe, na pušače, nepušače i bivše pušače (oni koji nisu pušili najmanje 6 meseci pre trenutka uključivanja u studiju).

Dalja podela pacijenata izvršena je na osnovu dijagnoze komorbiditeta. Podela je izvršena na osnovu prisustva ishemijske bolesti srca (IBS) i osteoporoze. Dijagnoza IBS postavljena je na osnovu preporuke European Society of Cardiology guidelines (45). Ishemijska bolest srca dijagnostikovana je kod 66% ispitivanih pacijenata. Od ukupnog broja u dalja ispitivanja uključeno je 35 pacijenata sa IBS, koji su ispunili uslov nepostojanja i drugih komorbiditeta. Kod ispitivanja rizika od razvoja osteoporoze, kriterijum za isključivanje iz studije bio je već dijagnostikovana osteoporoza i/ili frakture u poslednje 2 godine. Kontrolnu grupu čini 47 zdravih osoba, uparenih po godinama i polu sa pacijentima. Isključujući kriterijumi za predstavnike kontrolne grupe bile su sve sistemske bolesti, uključujući plućne i kardiovaskularne bolesti i osteoporozu, inflamacija, infekcije ili neurološke bolesti. Kod ispitivanja IBS kao komorbiditeta dodatni kriterijumi za isključivanje iz kontrolne grupe bila je dislipidemija ili upotreba hipolipemika. Kod ispitivanja osteoporoze dodatni kriterijum za isključivanje iz studije bila je postojeća dijagnoza osteoporoze ili frakture u poslednje 2 godine, kao i upotreba antiresorptivne i hormonske terapije. Žene uključene u kontrolnu grupu kod ispitivanja osteoporoze su postmenopauzalne, starije od 50 godina.

Prvi uzorak krvi uzet je na tašte nakon prijema pacijenata na kliničko lečenje, u okviru 24 sata. Nakon prijema na kliničko lečenje, pacijentima je data inhalaciona bronhodilatatorna terapija u obliku beta-2 agonista i/ili ipratropijum bromid. Tretman u toku hospitalizacije uključivao je primenu kiseonične terapije, beta-2 agoniste, ipratropijum, teofilin, antibiotike i sistemske kortikosteroide, u skladu sa težinom kliničke slike. Drugi uzorak krvi uzet je prilikom ispisa iz klinike. Treći uzorak je uzet na kontrolnom pregledu u klinički stabilnom stanju. Svi uzorci krvi uzimani su iz prednje kubitalne vene nakon perioda noćnog gladovanja (više od 10 sati). Krv je sakupljana vakutajner sistemima sa etilendiaminotetrasircetnom kiselinom (EDTA) (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ USA) za analizu parametara kompletne krvne slike i diferencijalne leukocitne formule i za izdvajanje plazme i vakutajnerima sa serum gel separatorom za dobijanje seruma. Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom određivana je neposredno nakon uzorkovanja, u skladu sa odgovarajućom procedurom. Ostali uzorci su čuvani na +4°C do najviše 24h, a zatim centrifugirani na 1500xg, deset minuta. Plazma i serum su odvajani u alikvote i čuvani na -80°C do trenutka analiziranja.

3.2. Antropometrijska merenja

Protokol studije uključivao je merenje visine i težine ispitanika. Merenja su vršena na prijemu pacijenata na kliničko lečenje kao i na kontrolnom pregledu. Na osnovu dobijenih mera računat je indeks telesne mase ($ITM = \text{težina(kg)} / \text{visina(m)}^2$).

3.3. Parametri respiratorne funkcije

Spirometrija je sprovedena u skladu sa ATS/ERS standardima (46). Mereni su forsirani ekspirijumski volumen ostvaren u prvoj sekundi (FEV_1) i forsirani vitalni kapacitet (FVC) na Master Scope spirometru (Viasys Healthcare GmbH, Höchberg, Germany). Arterijske gasne analize obuhvatile su određivanje parcijalnog arterijskog pritiska kiseonika (P_{a,O_2}) i ugljendioksida (P_{a,CO_2}), i sprovedene na Radiometrijskom automativanom analizatoru ABL5 (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

3.4. Parametri inflamacije

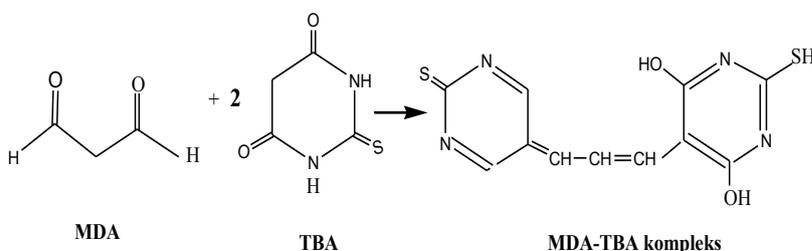
Koncentracija hsCRP merena je u serumu pomoću imunoturbidimetrije metode, komercijalnim testom (Quantex hsCRP kit, BIOKIT, Barcelona, Spain), na automatizovanom analizatoru ILAB 600. Procenat neutrofila određen je diferencijalnim brojanjem leukocita korišćenjem ABX Micros 60 analizatora (Horiba Medical, Montpellier, France).

3.5. Određivanje parametara oksidativnog statusa

Od parametara oksidativnog stresa određivan je nivo superoksidativnog anjona (O_2^-), malondialdehida (MDA), produkata uznapredovale oksidacije proteina (eng. Advanced oxidation protein product, AOPP) i totalni oksidativni status (TOS). Za određivanje antioksidativnog kapaciteta kod ispitanika određivana je aktivnost enzima antioksidativne zaštite superoksid-dismutaze (SOD) i paraoksonaze (PON1), kao i totalni antioksidativni status (TAS). Kao parametar odnosa oksidativnog i antioksidativnog statusa određivan je prooksidativni/antioksidativni balans (PAB).

3.5.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa

Koncentraciju MDA u plazmi određivana je Girotti-jevom metodom (47). Reakcija se zasniva na stvaranju kompleksa MDA i ostalih tiobarbiturna kiselina reagujućim supstratima sa tiobarbiturnom kiselinom koji imaju apsorpcioni maksimum na 535 nm.



Određivanje brzine stvaranja superoksidnog anjona je zasnovana na metodi koju su dali Auclair i Voisin (48). Metoda je zasnovana na sposobnosti superoksidnog anjon radikala da redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitroblueterazolijuma (NBT). Redukcija žuto obojenog NBT do plavog formazana koristi se kao mera stvaranja superoksidnog anjona u hemijskim i biološkim sistemima. Brzina generisanja superoksidnog anjona se izražava preko brzine stvaranja redukovanog NBT. Brzina redukovanja NBT se određuje kinetičkim postupkom, a izračunava se upotrebom molarnog ekstinkcionog koeficijenta monoformazana ($\epsilon=15\ 000\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Određivanje nivoa O_2^- u plazmi vrši se merenjem apsorbanse nastalog formazana na 550 nm.

Koncentraciju produkata uznapredovale oksidacije proteina, AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) određivali smo po Witko-Sarsat metodu (49). Produkti oksidacije proteina reaguju sa glacijalnom sirćetnom kiselinom i kalijum-jodidom pri čemu formiraju oranž produkte sa apsorpcionim maksimumom na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenta hloramina T koji se koristi za izradu stanardne krive, u koncentracijama 10-100 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu njegova apsorbaca linearno raste sa porastom koncentracije. Opseg vrednosti u populaciji zdravih iznosi od 50 do 150 $\mu\text{mol/L}$.

TOS je meren po Erelovoj metodi (50). Kao glavne komponente TOS sistema u serumu prisutni su H_2O_2 i lipidni hidroperoksidi. Ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju

fero jon Fe^{+2} -o-dianizidnog kompleksa u feri jon Fe^{+3} . Reakcija oksidacije olakšana je molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu. Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini, čiji se intenzitet boje meri na 560 nm. Kalibracija metode vrši se standardnim rastvorima vodonok-peroksida koncentracije 20 $\mu\text{mol/L}$ i 50 $\mu\text{mol/L}$.

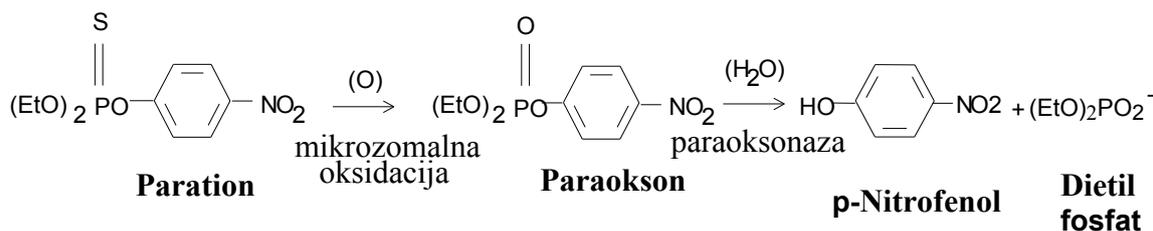
Prooksidativni/antioksidativni balans meren je na osnovu metode koju je postavio Alamdari (51). Metoda je zasnovana osobini hromogena 3,3',5,5'-tetrametilbenzina (TMB) da reaguje i sa oksidansima (vodonik-peroksidom) i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) u isto vreme. Reakcija sa H_2O_2 je enzimski katalizovana peroksidazom, pri čemu TMB nastaje plavo obojeni proizvod. Reakcija sa mokraćnom kiselinom nije enzimski katalizovana, već hemijska reakcija u kojoj nastaje bezbojni proizvod. Kapacitet antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj kiselini i izražava u $\mu\text{mol/L}$ mokraćne kiseline, dok se kapacitet prooksidanasa kalibriše prema H_2O_2 i izražava u $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Za pravljenje standardne krive koriste se rasvori mokraćne kiseline i H_2O_2 u različitim odnosima. Vrednosti PAB se izražavaju u arbitranim jedinicama HK (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnim rastvorima.

3.5.2. Određivanje parametara antioksidativne zaštite

Aktivnost SOD u plazmi određivana je prema metodu koji su dali Mirsa i Fridovich, uz određene modifikacije (52). Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u baznoj sredini. Aktivnost ovog enzima izražava se u relativnim jedinicama, koje se dobijaju merenjem apsorbance proizvoda oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (uzorak). Aktivnost SOD izražava se kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina (53).

Određivanje paraoksonazne aktivnosti se zasniva na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstart paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksona do p-nitrofenola; brzina te promene se prati kinetički na 405 nm.

Reakcija koju katalizuje enzim PON1:



TAS je određivan automatskom metodom po Erelu (50). U serumu antioksidativna svojstva imaju vitamin C, bilirubin, mokraćna kiselina, glutation i proteini, i njihov udeo u ukupnom antioksidativnom kapacitetu je najznačajniji upravo zbog visoke koncentracije. Doprinos antioksidativnoj zaštiti daju i supstance unete hranom, pre svega polifenoli. Svaka navedena komponenta iz seruma ima poznatu relativnu aktivnost, kao i procentualni doprinos kojim učestvuje u TAS. Test se izvodi uz upotrebu ABTS⁺ katjona kao hromogena. Sam ABTS rastvor je bezbojan. Nakon oksidacije do ABTS⁺ pomoću vodonik-peroksida u kiselom medijumu, rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Kada se obojeni ABTS⁺ rastvor pomeša sa supstancama koje mogu da se oksiduju, kao što su antioksidansi iz uzorka, dolazi do njegove redukcije u bezbojni ABTS. Intenzitet obezbojavanja izmeren na 660 nm, srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanata u ispitivanom uzorku.

3.6. Parametri lipidnog statusa

Koncentracije ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola su određivane rutinskim automatizovanim enzimskim metodama uz upotrebu Biomerieux-ovih reagenasa (Biomerieux, Paris, France) na biohemijskom analizatoru Hitachi 912. Koncentracije apolipoproteina A-I i apolipoproteina B su određivane imunoturbidimetrijskim metodama na biohemijskom analizatoru Hitachi 912 uz upotrebu Dialab-ovih komercijalnih testova (Dialab, Vienna, Austria).

3.7. Parametri proteaza/antiproteaza sistema

Koncentracije matriks metaloproteinaze-9 (MMP9), tkivnog inhibitora metaloproteinaza-1 (TIMP1), kao i kompleksa MMP9-TIMP1 određivane su komercijalnim ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testovima (Research and Diagnostics System, Minneapolis, MN, USA). Princip metode se zasniva na tome da su zidovi bunarčića eliza ploče obloženi primarnim antitelima (At) za odgovarajući protein (Ag). Dodatkom razblaženog uzorka u kome se nalazi antigen (Ag: MMP9, TIMP1 ili kompleks MMP9-TIMP1) dolazi do imunohemijske reakcije Ag-At. Višak uzorka se ispira a zatim dodaju sekundarna At obeležena peroksidazom. Supstrat za bojevu reakciju je rastvor tetrametil-benzidina (TMB) i vodonik-peroksida. Reakcija se zaustavlja dodatkom 1M H₂SO₄. ApSORBANCA dobijenog jedinjenja meri se na 450 nm. Koncentracije Ag očitavaju se iz standardnih kriva koje se dobijaju iz serije rastvora poznatih koncentracija.

3.8. Marker resorpcije kostiju

Koncentracija beta-izomera C-terminalnih telopeptida kolagena tipa I (beta-CL), proizvoda degradacije organskog koštanog tkiva, određivana je hemiluminiscentnom metodom iz uzoraka seruma. Princip testa se zasniva na sendvič reakciji između monoklonalnih anti-beta-CL antitela obeleženih biotinom i beta-CL iz uzorka. Dodatkom mikropartikula sa monoklonalnim anti-beta-CL-antitelima obeleženim rutenijum kompleksom formira se sendvič. Reakciona smeša se zatim aspirira u mernu ćeliju gde se mikropartikule vezuju magnetnom silom za površinu elektroda. Aplikacijom odgovarajućeg napona kroz elektrode indukuje se hemiluminiscentna emisija koja se meri nakon fotomultiplikacije.

3.9. Statistička analiza

Dobijeni rezultati u ovom istraživanju, ukoliko se radilo o kontinuiranim podacima, prikazivani su kao srednje vrednosti i standardne devijacije, ukoliko je raspodela ispitivanih sledila normalni tok. Kod parametara čija distribucija nije sledila normalni

tok, proveravana je distribucija logaritmovanih vrednosti i rezultati su prikazivani kao geometrijske sredine i intervali pouzdanosti. Varijable koje ni nakon logaritamske transformacije nisu pratile normalnu raspodelu prikazane su kao medijane (Me) i interkvartilni rasponi. Kontinuirane varijable koje slede normalnu raspodelu, kao i kontinuirane varijable koje posle logaritmovanja slede normalnu raspodelu (54), poređene su Studentovim t-testom ili testom analize varijanse (ANOVA), sa "Tukey's post hoc testom" za utvrđivanje grupa između kojih postoji statistički značajna razlika. Varijable koje ne prate normalnu raspodelu poređene su Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testovima. Kategorički podaci su prikazivani kao apsolutne frekvence, a razlike između njih testirane su upotrebom χ^2 testa.

Za ispitivanje korelacije između različitih parametara koji su određivani u studiji, korišćena je Spearmanova neparametarska korelaciona analiza. Multipla regresiona analiza je korišćena za identifikaciju nezavisnih faktora uticaja na pojedine promenljive.

U cilju provere prediktivne sposobnosti pojedinih parametara korišćena je binarna logistička regresiona analiza, a dijagnostička tačnost upotrebe ovih parametara proveravana je korišćenjem Receiver Operating Characteristics (ROC) krivih. Površina ispod krive bila je mera tačnosti ispitivanih parametara u identifikovanju pojedinaca sa povećanim rizikom za razvoj komorbiditeta.

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

Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskih programa MS Excel, CBstat (verzija 4.3.2 Kristian Linnet, Denmark) i Medcalc (MedCalc ver. 11.4 Software, Belgium).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Osnovni demografski podaci za pacijente sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća i kontrolnu grupu

Kao što je već navedeno u ovom istraživanju je učestvovalo 105 pacijenata sa opstruktivnom bolešću pluća i 47 zdravih osoba. Prilikom anketiranja ispitanika, uzeti su podaci o starosti, pušenju, izmerena im je visina i telesna težina. Kod pacijenata je takođe izvršena podela u skladu sa GOLD klasifikacijom po stadijumima bolesti. Dobijeni demografski podaci prikazani su u Tabeli 1.

Kontinuirani podaci sa normalnom raspodelom su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvence.

Starost, zastupljenost polova, telesna građa izražena kroz indeks telesne mase, kao i kategorije vezane za navike pušenja u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi ne pokazuju statistički značajne razlike. U grupi pacijenata zastupljeniji su pacijenti u poodmakloj fazi bolesti, stadijumi III i IV, u odnosu na pacijente u početnoj fazi bolesti, stadijum I i II.

Tabela 1. Osnovni demografski podaci o HOBP pacijentima i kontrolnoj grupi

Parametar	HOBP pacijenti	Kontrolna grupa	P
Broj ispitanika	105	47	0,01
Starost (godine)	61,9 ± 7,9	59,1 ± 4,4	ns
Pol			
Muškarci, n (%)	42 (40)	22 (47)	ns
Žene, n (%)	63 (60)	25 (53)	ns
ITM, (kg/m²)	24,4 ± 5,2	24,7 ± 2,8	ns
Pušenje			
Pušači, n (%)	35 (33)	14 (30)	ns
Nepušači, n (%)	20 (19)	12 (25)	ns
Bivši pušači, n (%)	50 (48)	45 (21)	ns
Trajanje bolesti (godine)	11,1 ± 9,2	/	/
Broj hospitalizacija	2,4 ± 1,6	/	/
GOLD klasifikacija, n (%)			
Stadijum I	4 (4)	/	/
Stadijum II	24 (23)	/	/
Stadijum III	49 (46)	/	/
Stadijum IV	28 (27)	/	/

p Studentov t-test za kontinuirane podatke, χ^2 test za kategoričke podatke; ITM = indeks telesne mase; GOLD = eng. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

4.2. Ispitivanje respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema kod HOBP pacijenata

Kod pacijenata su merenja parametara respiratorne funkcije, oksidativnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema izvršena na prijemu na kliničko lečenje (u stanju egzacerbacije), na otpustu sa kliničkog lečenja i kontrolnom pregledu (u klinički stabilnom stanju). Ispitivanja su bila usmerena na dokazivanje razlike u vrednostima ovih parametara kod pacijenata u sve tri tačke posmatranja u odnosu na grupu zdravih

osoba, kao i dokazivanje razlike u grupi pacijenata između tri tačke posmatranja, pre svega stanja egzacerbacije i klinički stabilnog stanja. Istovremeno su ispitane i korelacije između ovih parametara u ovim kliničkim stanjima.

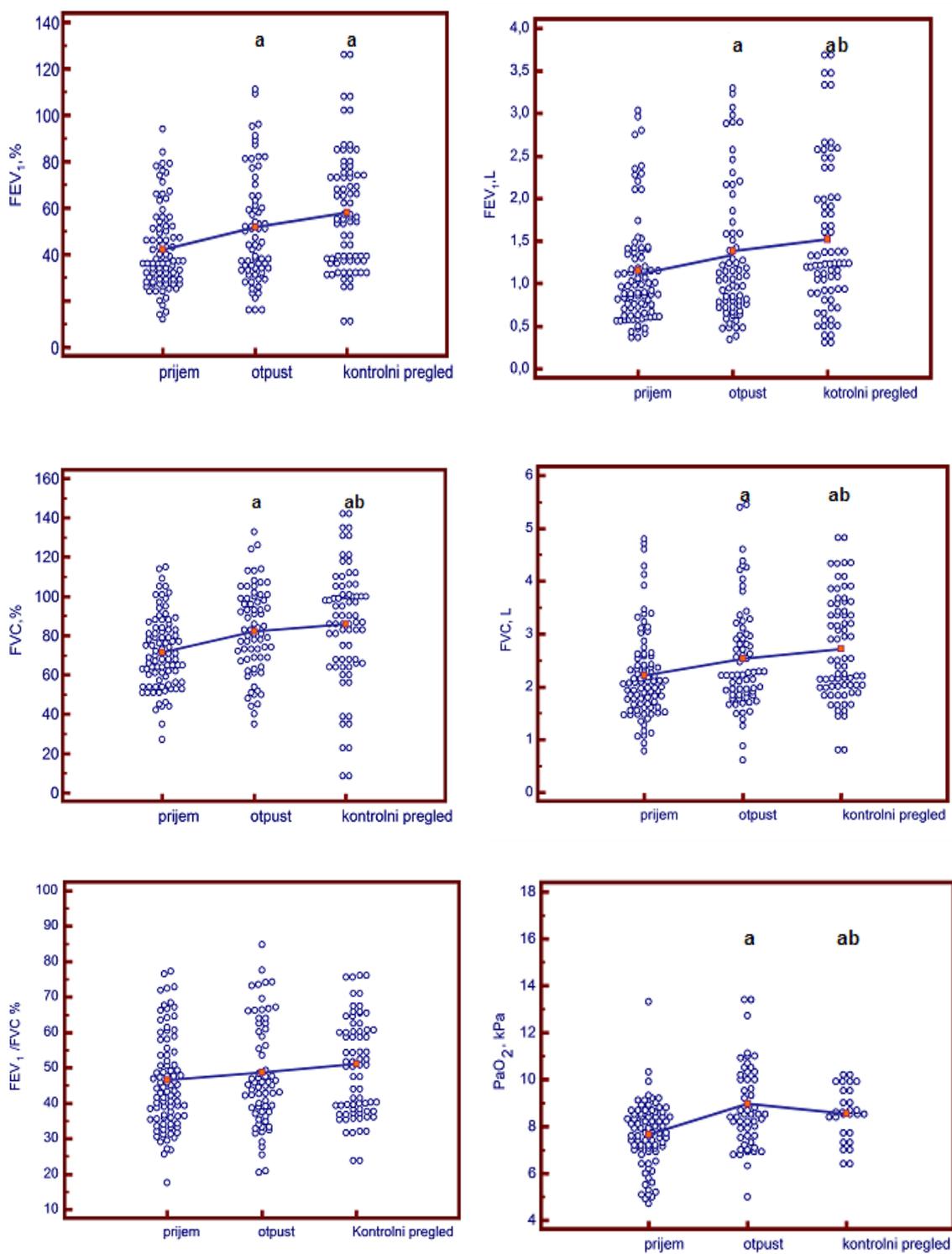
4.2.1. Parametri respiratorne funkcije kod HOBP pacijenata

U Tabeli 2 prikazane su vrednosti merenja parametara respiratorne funkcije kao srednje vrednosti i standardna devijacija u sve tri tačke ispitivanja. Analizom varijanse pokazana je statistički značajna razlika vrednosti svih parametara respiratorne funkcije, osim kod FEV₁/FVC odnosa, na otpustu i kontrolnom pregledu u odnosu na vrednosti sa prijema. Istovremeno je i izmerena vrednost P_{a,O₂} najniža na prijemu, u toku egzacerbacije sa porastom vrednosti u toku lečenja i padom na kontrolnom pregledu u odnosu na otpust ali i dalje statistički značajno više vrednosti u odnosu na prijem. Tendencija promena parametara respiratorne funkcije kod akutizacije bolesti, preko hospitalizacije i stabilizacije bolesti grafički su prikazani (Slika 1).

Tabela 2. Parametri respiratorne funkcije kod HOBP pacijenata na prijemu, otpustu i kontrolnom kliničkom pregledu

Parametar	Prijem	Otpust	Kontrolni pregled	p
FEV ₁ , %	1,11 ± 0,61	1,34 ± 0,83 ^a	1,47 ± 0,86 ^a	0,029
FEV ₁ , L	41,9 ± 17,4	51,7 ± 24,8 ^a	57,9 ± 25,2 ^{ab}	<0,0001
FVC, %	2,22 ± 0,84	2,54 ± 0,98 ^a	2,72 ± 0,96 ^{ab}	0,001
FVC, L	71,5 ± 18,3	82,2 ± 21,9 ^a	86,0 ± 29,6 ^{ab}	0,010
FEV ₁ /FVC %	46,5 ± 14,9	48,7 ± 15,7	51,2 ± 15,6	0,271
P _{a,O₂}	7,67 ± 1,38	8,98 ± 2,05 ^a	8,54 ± 1,14 ^{ab}	<0,0001

p ANOVA test; ^a statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa otpusta (Tukey's *post hoc* analiza)



Slika 6. Parametri respiratorne funkcije kod HOBP pacijenata na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu. ^a statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa otpusta (Tukey's *post hoc* analiza)

4.2.2. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod HOBP pacijenata i u kontrolnoj grupi

Pretpostavlja se da su pacijenti sa HOBP u stanju uznapredovalog oksidativnog stresa, kao i da nivo oksidativnog stresa zavisi od stanja u kome se nalaze, odnosno da li su u stanju egzacerbacije ili u stabilnom stanju. Da bi smo to dokazali analizirali smo parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u grupi pacijenata od egzacerbacije na prijemu, preko otpusta sa kliničkog lečenja do klinički stabilnog stanja na kontrolnom pregledu i upoređivali sa vrednostima u kontrolnoj grupi (Tabela 3).

Tabela 3. Vrednosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod HOBP pacijenata na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu i u kontrolnoj grupi

Parametar	HOBP pacijenti			Kontrolna grupa	p
	Prijem	Otpust	Kontrolni pregled		
O ₂ ⁻ , μmol/L	96,2 ± 21,9 ^a	98,8 ± 24,4 ^{ac}	87,0 ± 26,1 ^a	31,4 ± 12,1	0,032
MDA, μmol/L	1,10 ± 0,53	1,53 ± 0,37 ^{abc}	1,30 ± 0,40 ^a	1,11 ± 0,23	<0,001
AOPP, μmol/L	54,7 ± 21,4 ^a	65,2 ± 29,8 ^{abc}	55,8 ± 15,8 ^a	20,31 ± 3,7	0,012
TOS, mmol/L	15,9 ± 8,8 ^a	18,2 ± 6,6 ^{abc}	14,4 ± 6,5 ^a	10,1 ± 3,5	0,030
SOD, U/L	21,7 ± 9,1 ^a	21,3 ± 8,6 ^{ac}	17,5 ± 7,3 ^a	30,1 ± 9,5	0,042
POaza, U/L [#]	245 (210 – 286)	305 (251 – 372)	230 (174 – 303)	319 (279 – 363)	0,127
TAS, μmol/L	0,760 ± 0,275	0,712 ± 0,236 ^{ac}	0,836 ± 0,353	0,925 ± 0,189	0,072*
PAB, HKU	130,5 ± 41,3	114,6 ± 44,5 ^a	125,2 ± 41,3	80,7 ± 18,1	0,070*

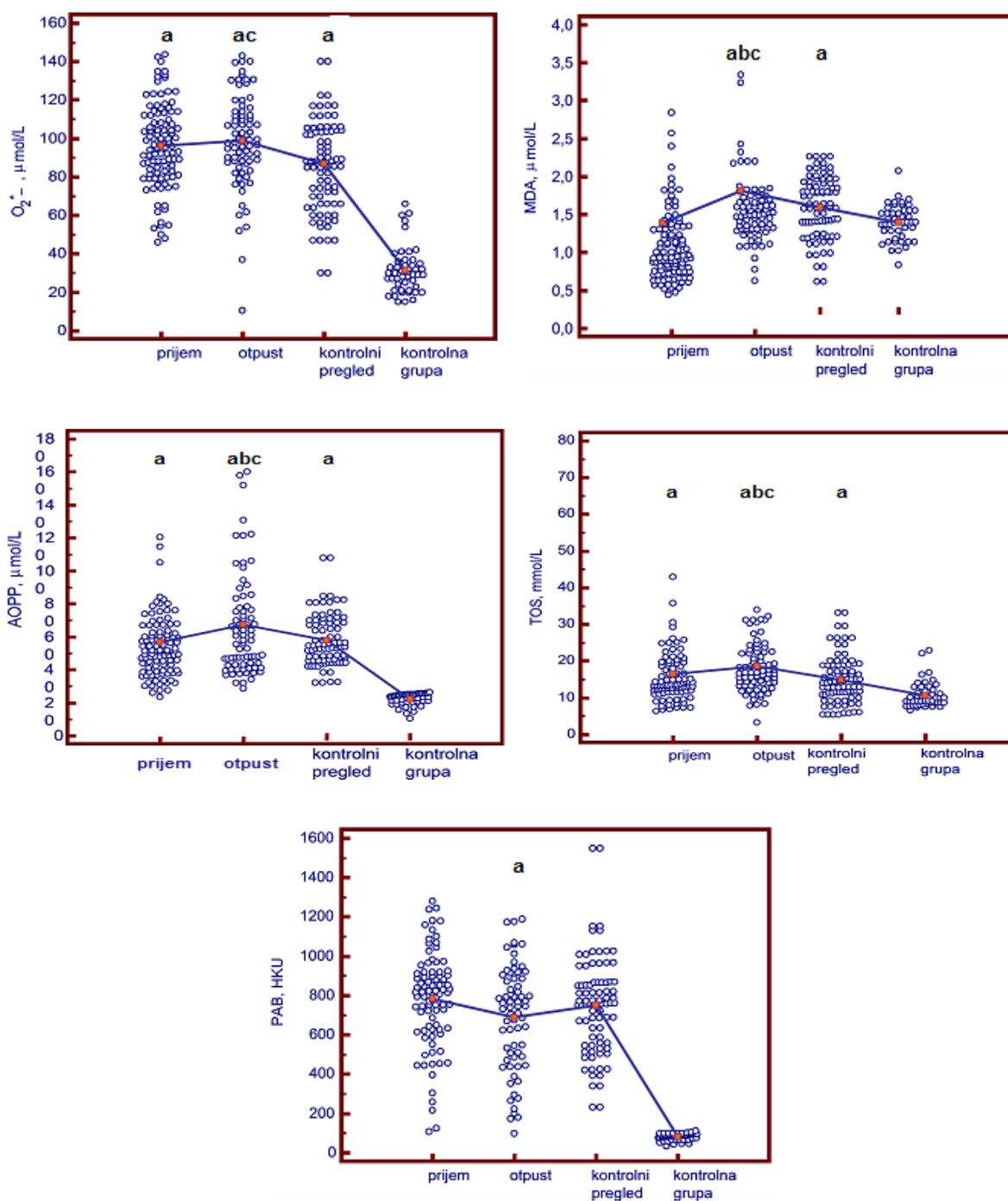
p ANOVA test; ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^c statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa kontrolnog pregleda, (Tukey' s *post hoc* analiza); [#] vrednosti predstavljene kao geometrijska sredina (25.-75. percentil); * granična vrednost p.

Vrednosti aktivnosti POaza prikazane su kao geometrijske srednje vrednosti i interval 25-75. percentil, jer je dobijena normalna raspodela tek posle logaritmovanja vrednost, dok su ostali parametri prikazani kao srednja vrednost i standardna devijacija. Za poređenje vrednosti kod pacijenata i u kontrolnoj grupi korišćena je analiza varijanse, a u tabeli je prikazan nivo značajnosti (p) za izračunato F.

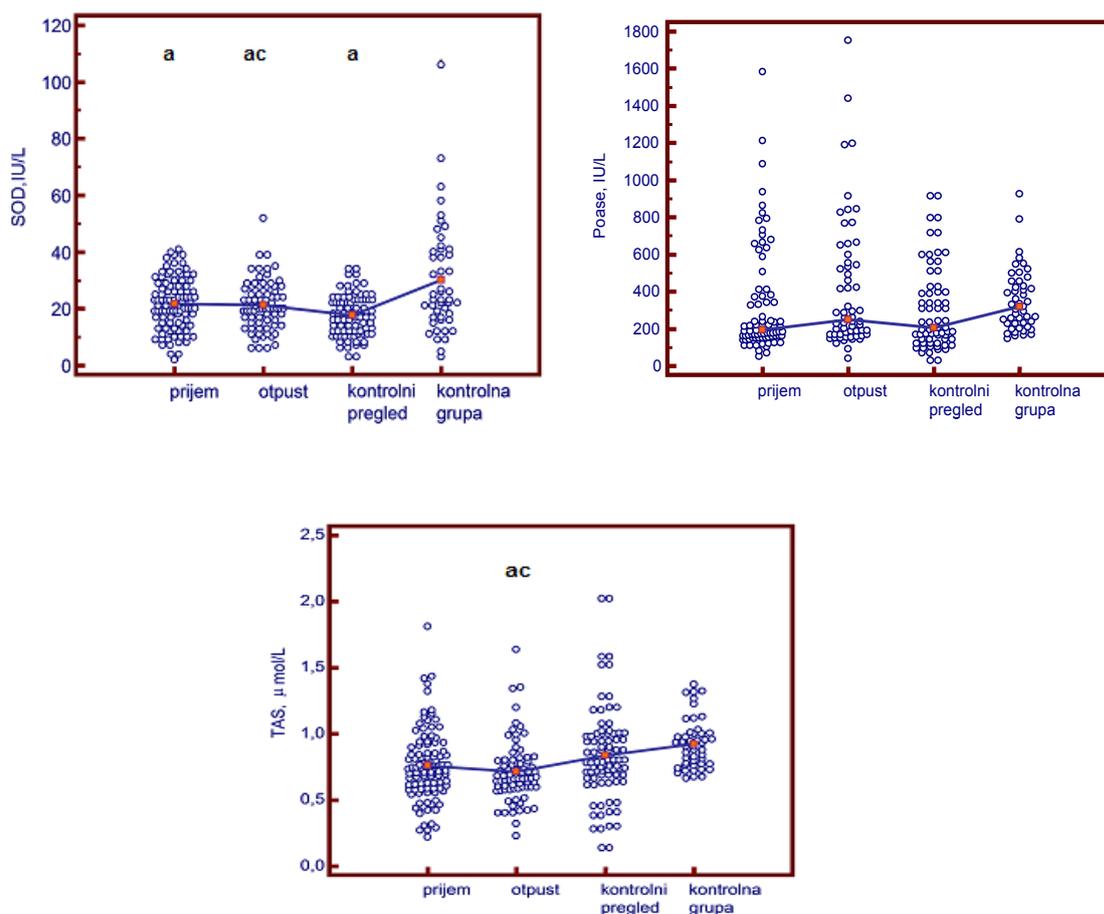
Koncentracije parametara oksidativnog stresa, O_2^- , MDA, AOPP i TOS su statistički značajno više kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu u sve tri tačke praćenja pacijenata (Slika 7). Kada posmatramo promene koncentracija parametara oksidativnog stresa kroz faze oporavka uočavamo da koncentracije svih parametara rastu u toku kliničkog lečenja, sa trendom opadanja na kontrolnom pregledu, ali se i dalje zadržava statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod parametara antioksidativne zaštite, SOD, POaza i TAS, uočen je drugačiji trend promene vrednosti kroz faze oporavka pacijenata i u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 8). Aktivnost SOD, koja je najviša na prijemu, polako opada do otpusta i kontrolnog pregleda, i sve vreme je statistički značajno niža u odnosu na zdrave u kontrolnoj grupi. Aktivnost POaze je kod pacijenata takođe niža u odnosu na kontrolnu grupu, ali ta razlika nije statistički značajna. Kod ovog enzima antioksidativne zaštite, za razliku od SOD, postoji trend porasta tokom kliničkog lečenja, na kontrolnom pregledu su te vrednosti niže u odnosu na prijem, ali ta razlika nije statistički značajna. Vrednosti TAS kod pacijenata su takođe niže u odnosu na kontrolnu grupu, od prijema do otpusta se smanjuju, na kontrolnom pregledu su nešto više, ali i kod ovog parametra nema statistički značajne razlike.

Vrednosti PAB koje predstavljaju odnos snaga prooksidativnog i antioksidativnog sistema više su kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, što je posledica pojačanog oksidativnog stresa i smanjene antioksidativne zaštite u odnosu na zdrave osobe u kontrolnoj grupi. Kod pacijenata je izmerena viša vrednost PAB u odnosu na zdrave, ali ova razlika nije statistički značajna.



Slika 7. Grafički prikaz vrednosti parametara oksidativnog stresa na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu pacijenata i u kontrolnoj grupi. ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^c statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa kontrolnog pregleda, (Tukey' s *post hoc* analiza).



Slika 8. Grafički prikaz vrednosti parametara antioksidativne zaštite (B) na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu pacijenata i u kontrolnoj grupi. ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^c statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa kontrolnog pregleda, (Tukey' s *post hoc* analiza).

4.2.3. Parametri inflamacije kod HOBP pacijenata i u kontrolnoj grupi

Poznato je da je jedna od osnovnih karakteristika HOBP hronična inflamacija. U cilju praćenja inflamacije u zavisnosti od stanja u kome se pacijenti nalaze određeni su koncentracija hsCRP i procenat neutrofila u leukocitarnoj formuli.

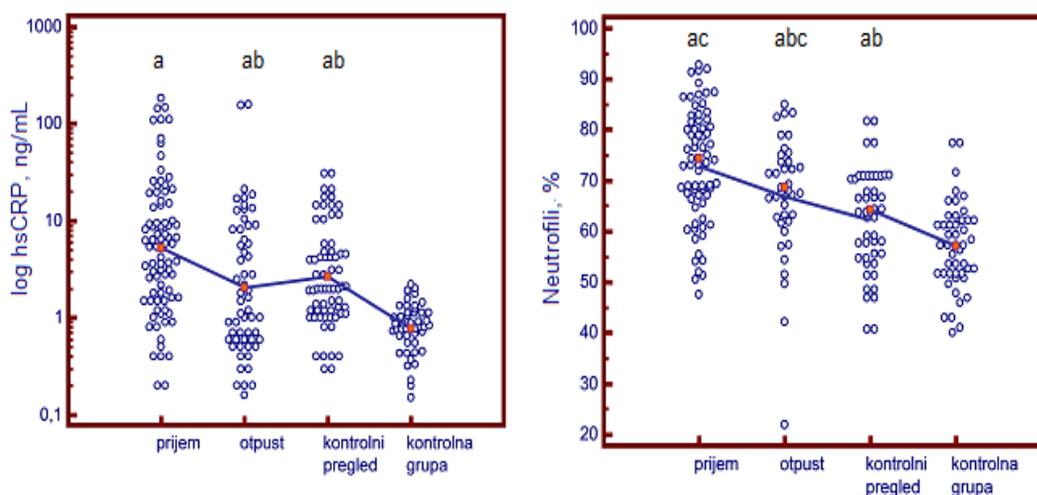
Vrednosti hsCRP prikazane su kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti, jer je normalna raspodela dobijena nakon logaritamske transformacije. Procenat neutrofila prikazan je kao srednja vrednost i standardna devijacija. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 4 i na Slici 9.

Analizom varijanse pokazano je značajno povećanje oba parametra inflamacije kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti hsCRP i procenat neutrofila su statistički značajno više na prijemu u odnosu na otpust i kontrolni pregled, s tim da je koncentracija hsCRP viša na kontrolnom pregledu u odnosu na otpust, dok procenat neutrofila opada u odnosu na otpust.

Tabela 4. Vrednosti parametara inflamacije kod HOBP pacijenata na prijemu, otpustu i kontrolnom kliničkom pregledu i u kontrolnoj grupi

Parametar	HOBP pacijenti			Kontrolna grupa	p
	Prijem	Otpust	Kontrolni pregled		
hsCRP, ng/mL [#]	5.96 ^a (1.26 - 8.34)	2.06 ^{ab} (1.34 - 3.16)	2.67 ^{ab} (1.75 - 4.08)	0.90 (0.68 - 1.00)	0.001
Neutrofili, %	72.9 ± 11.2 ^{ac}	66.8 ± 12.0 ^{abc}	62.2 ± 10.1 ^{ab}	54.7 ± 5.8	0.0001

p za ANOVA test; ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^c statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa kontrolnog pregleda, (Tukey' s *post hoc* analiza); [#] vrednosti predstavljene kao geometrijska sredina (25.-75. percentil)



Slika 9. Grafički prikaz vrednosti parametara inflamacije na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu pacijenata i u kontrolnoj grupi. ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^c statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa kontrolnog pregleda, (Tukey' s *post hoc* analiza)

4.2.4. Parametri proteaza/antiproteaza sistema kod HOBP pacijenata i kontrolnoj grupi

Pretpostavka da kod HOBP pacijenata postoji disbalans proteaza/antiproteaza sistema ispitana je određivanjem koncentracija proteaze MMP9 i antiproteaze TIMP1, kao i njihovog kompleksa. Koncentracije sva tri parametara izražene su kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti, nakon logaritamske transformacije vrednosti. Analizom varijanse ispitana je razlika u koncentracijama ovih parametara između pacijenata i kontrolne grupe. Rezultati su prikazani u Tabeli 5 i na Slici 10.

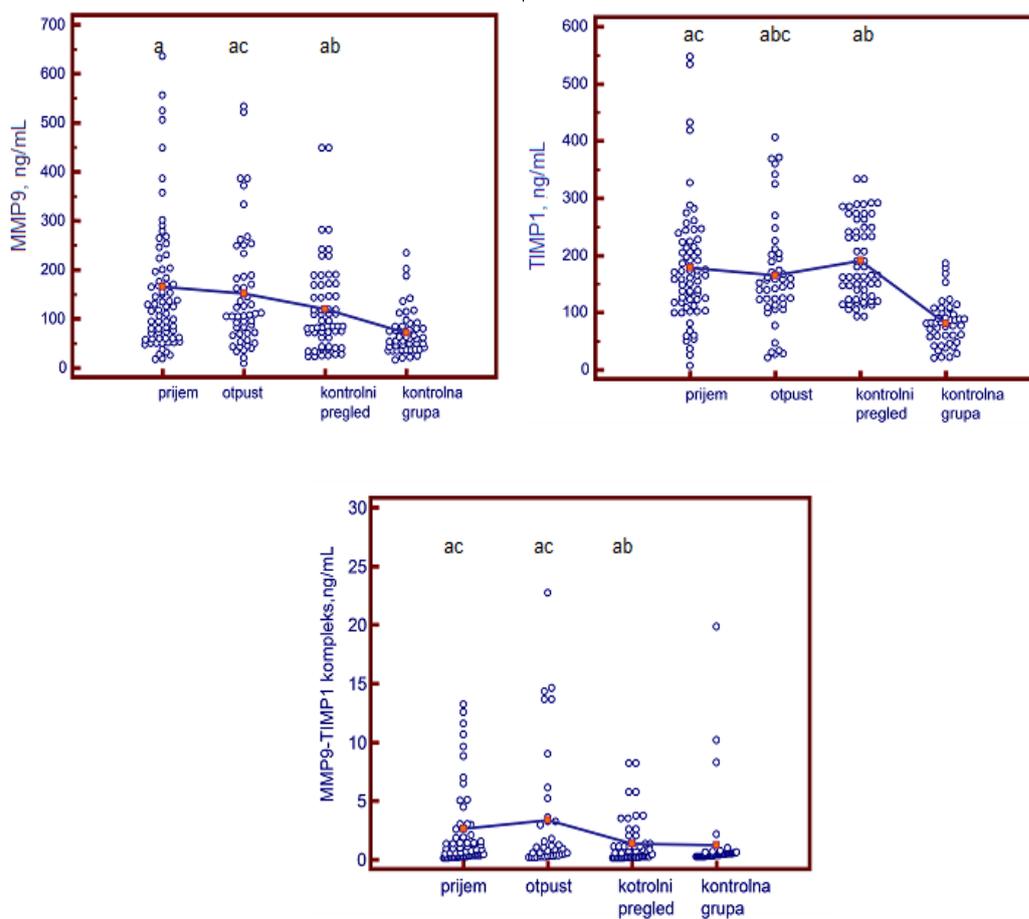
Tabela 5. Vrednosti parametara proteaza/antiproteaza sistema kod HOBP pacijenata na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu i u kontrolnoj grupi

Parametar	HOBP pacijenti			Kontrolna grupa	p
	Prijem	Otpust	Kontrolni pregled		
MMP9, ng/mL	118 ^a (97 – 144)	111 ^{ac} (88 – 141)	92 ^{ab} (69 – 122)	60 (51 -72)	0.01
TIMP1, ng/mL	149 ^{ac} (126 – 176)	136 ^{abc} (111 – 167)	178 ^{ab} (155 – 205)	72 (61 – 84)	0.001
Kompleks MMP9-TIMP1, ng/mL	0.954 ^{ac} (0.675-1.348)	1.102 ^{ac} (0.670-1.812)	0.585 ^{ab} (0.347-0.988)	0.487 (0.369-0.646)	0.01

p ANOVA test; ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu; ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^c statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa kontrolnog pregleda, (Tukey' s *post hoc* analiza)

Koncentracija proteaze MMP9 statistički je značajno je viša kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu u sve tri tačke, ali bez značajne razlike između vrednosti na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu. Koncentracije MMP9 najviše su na prijemu, u stanju egzacerbacije i daljom stabilizacijom stanja pacijenata koncentracije opadaju. Koncentracije TIMP1 su takođe statistički značajno više kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti na prijemu i otpustu su niže u odnosu na vrednosti na kontrolnom pregledu, ali razlika nije statistički značajna. Vrednosti kompleksa MMP9-

TIMP1 kod pacijenata statistički značajno su više na prijemu i otpustu od vrednosti u kontrolnoj grupi, kao i od vrednosti na kontrolnom pregledu, koje se približavaju vrednostima u kontrolnoj grupi.



Slika 10. Grafički prikaz vrednosti parametara proteaza/antiproteaza sistema na prijemu, otpustu i kontrolnom pregledu pacijenata i u kontrolnoj grupi. ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu, ^b statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa prijema; ^c statistički značajno različit u odnosu na vrednosti sa kontrolnog pregleda, (Tukey' s *post hoc* analiza)

4.2.5. Korelacija između ispitivanih parametara

Da bi se ispitala eventualna korelacija između ispitivanih parametara kod HOBP pacijenata korišćena je metoda Spearman-ove neparametarske korelacione analize.

Korelacija između parametara respiratorne funkcije i parametara oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema

Procenat predviđenog FEV₁ u negativnoj je korelaciji sa koncentracijom superoksidnog anjona na prijemu, dok na kontrolnom pregledu pokazuje negativnu korelaciju sa AOPP, procentom neutrofila i TIMP1. FEV₁ izražen u litrima ne pokazuje nikakvu korelaciju ni sa jednim parametrom oksidativnostresnog statusa, inflamacije ili proteaza/antiproteaza sistema.

Na prijemu vrednosti % FVC ne pokazuju korelaciju ni sa jednim ispitivanim parametrom. Na kontrolnom pregledu postoji negativna korelacija sa AOPP i TIMP1. Vrednosti FVC izražene u L u negativnoj su korelaciji sa TOS i PAB vrednostima na prijemu, dok na kontrolnom pregledu ne postoji korelacija ni sa jednim ispitivanim parametrom.

Odnos FEV₁/FVC % na prijemu je u negativnoj korelaciji sa koncentracijom superoksidnog anjona i AOPP, dok na kontrolnom pregledu nije dokazana korelacija ni sa jednim od ispitivanih parametara.

Parcijalni arterijski pritisak kiseonika pokazao je pozitivnu korelaciju sa aktivnošću SOD u stanju egzacerbacije dok kod klinički stabilnih pacijenata ne postoji korelacija ni sa jednim parametrom oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema.

Rezultati neparametarske korelacije prikazane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Korelacija između parametara respiratorne funkcije i parametara oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema

Parametar	FEV ₁ , %		FEV ₁ , L		FVC, %		FVC, L		FEV ₁ /FVC %		Pa _{o2} , kPa	
	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled
O ₂ ⁻ , μmol/L	-0,228*	-0,032	-0,178	-0,097	-0,034	-0,038	-0,102	-0,037	-0,277**	-0,138	-0,043	-0,237
MDA, μmol/L	-0,039	-0,089	-0,013	-0,018	-0,025	-0,102	-0,025	-0,099	-0,075	-0,018	-0,189	-0,115
AOPP, μmol/L	-0,152	-0,158	-0,138	-0,292*	-0,079	-0,089	-0,064	-0,308*	-0,207*	-0,082	-0,014	-0,020
TOS, mmol/L	-0,095	-0,102	-0,029	-0,182	-0,105	-0,074	-0,259*	-0,173	-0,175	-0,039	-0,086	-0,043
SOD, U/L	-0,147	-0,264	0,068	-0,219	-0,130	-0,116	-0,126	0,112	0,043	-0,210	0,233*	0,034
POaza, U/L	0,129	-0,104	0,093	-0,106	0,042	-0,106	0,103	-0,077	0,128	-0,024	0,073	0,192
TAS, μmol/L	0,054	0,018	0,047	0,015	0,083	0,009	0,116	0,034	0,043	0,141	0,096	0,168
PAB, HKU	-0,067	0,014	-0,072	-0,117	-0,080	-0,052	-0,216*	-0,121	-0,047	-0,033	-0,058	0,009
hsCRP, ng/mL	-0,155	-0,016	-0,117	-0,049	-0,189	-0,184	-0,058	-0,261	-0,114	-0,239	-0,196	-0,367
Neutrofili, %	-0,184	-0,340	-0,073	-0,415*	-0,164	-0,195	-0,025	-0,292	-0,077	-0,131	-0,174	-0,583
MMP9, ng/mL	-0,041	-0,101	-0,072	-0,124	-0,016	-0,137	-0,085	-0,106	-0,081	-0,058	-0,187	-0,314
TIMP1, ng/mL	0,044	-0,242	0,036	-0,384*	0,033	-0,219	0,041	-0,355*	0,113	-0,079	0,093	-0,089
MMP9-TIMP1, ng/mL	0,086	-0,125	0,059	-0,015	0,024	-0,174	0,030	-0,058	0,104	0,030	0,207	0,077

Korelacija između parametara oksidativnostresnog statusa i parametara inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema

Kod vrednosti koje su dobijene na prijemu postoji značajna pozitivna korelacija samo između koncentracije hsCRP i nivoa PAB, a procenat neutrofila nije u korelaciji ni sa jednim parametrom oksidativnog statusa. U vrednostima na kontrolnom pregledu ne postoji korelacija između parametara inflamacije i oksidativnog statusa.

Kod vrednosti koje su dobijene na prijemu, kao ni kod vrednosti koje su dobijene u stabilnom stanju, nema korelacije između parametara proteaza/antiproteaza sistema i superoksidnog anjona, odnosno PAB.

U stanju egzacerbacije je dobijena pozitivna korelacija između koncentracije AOPP i koncentracije svih ispitivanih parametara proteaza/antiproteaza sistema, odnosno MMP9, TIMP1 i kompleksa MMP9-TIMP1. U ovom stanju je dobijena i pozitivna korelacija između TOS i MMP9, TOS i TIMP1, POaza i TIMP1, a negativna korelacija između SOD i MMP9.

U stabilnom stanju je dobijena negativna korelacija između MDA i TIMP1, kao i pozitivna korelacija između TOS i MMP9, TOS i kompleksa MMP9/TIMP1, SOD i kompleksa MMP9-TIMP1 i TAS i TIMP1.

Svi rezultati korelacije parametara oksidativnog stresa sa parametrima inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema na prijemu i kontrolnom pregledu prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Korelacija parametara oksidativnostresnog statusa sa parametrima inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema na prijemu i kontrolnom pregledu

Parametar	hsCRP, ng/mL		Neutrofili, %		MMP9, ng/mL		TIMP1, ng/mL		Kompleks MMP9-TIMP1, ng/mL	
	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled
O₂⁻, μmol/L	0,202	0,120	0,093	0,174	0,138	0,028	0,094	0,210	0,169	0,144
MDA, μmol/L	0,104	0,232	0,086	0,380	0,022	0,284	0,058	0,434	-0,020	-0,263
AOPP, μmol/L	0,189	0,014	0,207	0,103	0,292**	0,047	0,372**	0,158	0,390**	-0,083
TOS, mmol/L	0,026	0,193	0,057	0,346	0,230*	0,357*	0,243*	0,199*	0,184	0,470**
SOD, U/L	-0,055	-0,237	-0,153	-0,196	-0,226*	0,214	-0,146	0,168	-0,348**	0,477*
POaza, U/L	0,158	0,287	0,069	0,159	0,040	0,198	0,270*	0,108	0,167	0,142
TAS, μmol/L	-0,216	-0,067	-0,197	-0,021	-0,173	-0,120	-0,143	-0,410*	-0,176	-0,184
PAB, HKU	0,283*	0,146	0,020	0,074	0,103	-0,212	0,045	-0,125	0,126	-0,075

*p<0.05, **p<0,01; U tabeli su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta neparametarske korelacije

Korelacija između parametara inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema

U stanju egzacerbacije, odnosno na prijemu pacijenata na kliničko lečenje, koncentracija hsCRP pokazuje pozitivnu korelaciju sa koncentracijom antiproteaze TIMP1, dok ne postoji korelacija sa koncentracijom proteaze MMP9, kao ni njihovim kompleksom. Procenat neutrofila u ovoj tački u pozitivnoj je korelaciji sa koncentracijom kompleksa MMP9-TIMP1, a nema korelacije sa MMP9 ili TIMP1. U klinički stabilnom stanju se gubi korelacija između hsCRP i TIMP1, dok procenat neutrofila zadržava pozitivnu korelaciju sa koncentracijom kompleksa MMP9-TIMP1 a pokazuje pozitivnu korelaciju i sa koncentracijom MMP9. Rezultati ove statističke analize prikazane su u Tabeli 8.

Tabela 8. Korelacija parametara inflamacije sa parametrima proteaza/antiproteaza sistema na prijemu i kontrolnom pregledu

Parametar	hs CRP, ng/mL		Neutrofili, %	
	Prijem	Kontrolni pregled	Prijem	Kontrolni pregled
MMP9, ng/mL	0,127	0,201	0,248	0,514*
TIMP1, ng/mL	0,327*	0,272	0,218	0,452
Kompleks MMP9-TIMP1, ng/mL	0,104	0,219	0,326*	0,676**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; U tabeli su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta neparametarske korelacije

4.3. Ispitivanje resorpcije koštanog tkiva kod HOBP

Visoka zastupljenost osteoporoze kod HOBP pacijenata ukazuje na disbalans između resorpcije koštanog tkiva i njegove sinteze. Eventualno postojanje pojačane resorpcije koštanog tkiva ispitivali smo određivanjem koncentracije beta-CL. Daljom statističkom analizom ispitana je promena u koncentracijama ovog parametra u zavisnosti od stanja pacijenta, pola, pušenja kao i korelacija sa drugim ispitivanim parametrima.

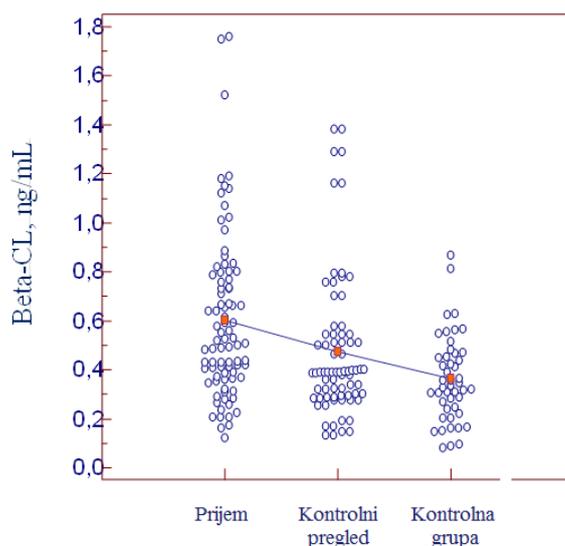
4.3.1. Ispitivanje promene u koncentraciji beta-CL kod HOBP pacijenata

Postojanje povećane resorpcije koštanog tkiva u stanju egzacerbacije kod HOBP pacijenata u odnosu na stabilno stanje ispitano je merenjem koncentracije beta-CL. Vrednosti su izražene kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti. Za ispitivanje razlike u koncentracijama beta-CL između dva stanja korišćen je Studentov test parova, a za ispitivanje razlike u koncentracijama između pacijenata i kontrolne grupe Studentov t-test za nezavisne grupe. Rezultati su prikazani u Tabeli 9 i na Slici 11. Koncentracija beta-CL statistički je značajno je veća u odnosu na kontrolnu grupu u oba stanja i istovremeno veća na prijemu u odnosu na kontrolni pregled.

Tabela 9. Vrednosti parametra resorpcije koštanog tkiva na prijemu i kontrolnom pregledu kod HOBP pacijenata i u kontrolnoj grupi

Parametar	HOBP pacijenti		Kontrolna grupa	p
	Prijem	Kontrolni pregled		
Beta-CL, ng/mL	0,521 ^a (0,463-0,587)	0,408 ^{ab} (0,340-0,490)	0.362 (0,323 -0,416)	0,001

p ANOVA test; ^a Studentov test parova, statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu; ^b Studentov test parova, statistički značajno u odnosu na prijem.



Slika 11. Koncentracije beta-CL kod pacijenata na prijemu i kontrolnom pregledu i u kontrolnoj grupi

4.3.2. Korelacija koncentracija beta-CL sa parametrima respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema

Rezultati statističke analize pokazali su da ne postoji korelacija između nivoa beta-CL ni sa jednim parametrom respiratorne funkcije kako na prijemu tako i na kontrolnom pregledu.

Pozitivna korelacija dokazana je između MDA i POaza i beta-CL na prijemu, dok na kontrolnom pregledu nije dokazana nikakva korelacija između nivoa beta-CL i parametara oksidativnog statusa. Nepostojanje korelacije između nivoa beta-CL i parametara oksidativnog statusa dokazano je i u kontrolnoj grupi ispitanika.

U stanju egzacerbacije dokazana je pozitivna korelacija sa procentom neutrofila, dok se ova korelacija gubi u stabilnom stanju. U stabilnom stanju postoji pozitivna korelacija između hsCRP i beta-CL, bez korelacije ovih parametara u stanju egzacerbacije.

U stanju egzacerbacije ne postoji korelacija između nivoa beta-CL ni sa jednim parametrom proteaza/antiproteaza sistema. U stabilnom stanju postoji pozitivna korelacija beta-CL sa TIMP1. Ispitivanjem u kontrolnoj grupi nije dokazana korelacija beta CL ni sa jednim parametrom proteaza/antiproteaza sistema.

Tabela 10. Korelacija koncentracija beta-CL sa parametrima respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema na prijemu i kontrolnom pregledu kod HOBP pacijenata

Parametar	Beta-CL, ng/mL	
	Prijem	Kontrolni pregled
FEV ₁ , %	-0,076	-0,230
FEV ₁ , L	-0,102	-0,244
FVC, %	-0,191	-0,285
FVC, L	-0,060	-0,199
FEV ₁ /FVC %	0,096	0,062
P _{a,O₂} , kPa	-0,147	-0,490
O ₂ ⁻ , μmol/L	0,065	0,032
MDA, μmol/L	0,245*	0,221
AOPP, μmol/L	0,008	0,038
TOS, mmol/L	0,046	0,103
SOD, U/L	0,001	0,063
POaza, U/L	0,273*	0,249
TAS, μmol/L	-0,093	-0,097
PAB, HKU	0,043	0,044
hsCRP, ng/ml	0,115	0,365*
Neutrofili, %	0,284*	0,256
MMP9, ng/mL	0,024	0,070
TIMP1, ng/mL	0,125	0,451*
Kompleks MMP9-TIMP1, ng/mL	0,164	0,028

*p<0.05; U tabeli su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta neparametarske korelacije

U cilju ispitivanja uticaja pojedinih parametara na nivo beta-CL u stanju egzacerbacije, korišćena je multipla regresiona analiza (Tabela 11). Formirani su modeli koji ispituju uticaj markera respiratorne funkcije, inflamacije i oksidativnostresnog statusa na nivo beta-CL. Rezultati ove analize pokazuju da su % neutrofila i nivo TIMP1 odgovorni za 18% varijabilnosti koncentracije beta-CL, (Model 1), ako se doda i uticaj hipoksije

(Model 2), 25% varijabilnosti beta-CL posledica je njihovog udruženog efekta. Kao najbolji model pokazao se Model 3 koji pored pomenutih uključuje i TOS i PON1. Ovaj model pokazuje da je skoro 60% varijabilnosti u koncentraciji beta-CL posledica interakcije respiratorne disfunkcije, inflamacije i oksidativnostresnog statusa.

Tabela 11. Multipla linearna regresiona analiza parametara inflamacije, respiratorne funkcije i oksidativnog stresa i njihovog uticaja na promenu koncentracije beta CL u egzacerbaciji

Parametar	OR (95% IP)	p
Model 1. Adjusted R²=0.180		
Neutrofili, %	0,011 (0,002 - 0,020)	0,016
TIMP1, ng/mL	-0,001 (-0,002 - 0,000)	0,027
Model 2. Adjusted R²=0.256		
Neutrofili, %	0,010 (-0,001 - 0,020)	0,082
TIMP1, ng/mL	-0,001 (-0,002 - 0,000)	0,038
P _{a,O2} , kPa	-0,096 (-0,185 - -0,007)	0,035
Model 3. Adjusted R²=0.581		
Neutrofili, %	0,009 (0,000 - 0,017)	0,040
TIMP1, ng/mL	-0,002 (-0,003 - -0,001)	0,000
P _{a,O2} , kPa	-0,065 (-0,143 - 0,014)	0,101
TOS, mmol/L	0,023 (0,002 - 0,044)	0,035
PO ₂ , U/L	0,001 (0,000 - 0,001)	0,000

OR= eng. Odd ratio; IP= interval pouzdanosti

4.4. Ispitivanje respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema kod HOBP pacijenata u zavisnosti od prisustva ishemijske bolesti srca (IBS)

Jedan od ciljeva istraživanja ove studije bio je ispitivanje veze između respiratorne funkcije, inflamacije, oksidativnog statusa i proteaza/antiproteaza sistema i razvoja ishemijske bolesti srca kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća. U ovu fazu ispitivanja uključeno je 60 pacijenata u klinički stabilnom stanju, od kojih je kod 36 pacijenata dijagnostikovana IBS. Osnovni podaci o ovim pacijentima i kontrolnoj grupi prokazani su u Tabeli 12. Za ispitivanje razlike kod kategoričkih parametara korišćen je χ^2 test a Studentov t-test kod kontinuiranih parametara. Na osnovu ovih analiza utvrđena je homogenost između zastupljenosti polova i navika pušenja kako između podgrupa HOBP pacijenata tako i sa kontrolnom grupom. Pacijenti sa IBS su stariji u odnosu na pacijente bez IBS.

Tabela 12. Osnovni demografski podaci HOBP pacijenata sa IBS i bez IBS

Parametar	HOBP pacijenti		Kontrolna grupa
	IBS +	IBS -	
Broj ispitanika, n	36	24	47
Pol			
Muškarci, n (%)	17 (47)	13 (54)	22 (47)
Žene, n (%)	19 (53)	11 (46)	25 (53)
Starost, godine	63,6 ± 7,9 ^a	58,4 ± 14,8	59,1 ± 4,4
Pušenje			
Pušači, n (%)	16 (44)	8 (33)	14 (30)
Nepušači, n (%)	12 (33)	11 (46)	21 (45)
Bivši pušači, n (%)	8 (23)	5 (21)	12 (25)

p ANOVA; ^a statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu (Tukey's *post hoc* analiza)

4.4.1. Parametri respiratorne funkcije kod pacijenata sa i bez IBS

Poređenjem parametara respiratorne funkcije između pacijenata sa i bez IBS, dokazano je da pacijenti sa IBS imaju redukovaniji respiratorni kapacitet. Naime, Studentovim t-testom dokazana je statistički značajna razlika u vrednostima FEV₁ i FVC. Istovremeno je PaO₂ kod pacijenata bez IBS viši u odnosu na pacijente sa IBS, ali ova razlika nije statistički značajna. Rezultati su prikazani u Tabeli 13.

Tabela 13. Poređenje parametara respiratorne funkcije između pacijenata sa i bez IBS

Parametar	HOBP pacijenti		p
	IBS +	IBS -	
FEV ₁ , %	58,2 ± 16,2	68,5 ± 19,2	0,047
FEV ₁ , L	1,59 ± 0,61	1,94 ± 0,78	0,038
FVC, %	74,8 ± 7,2	86,2 ± 7,8	0,013
FVC, L	2,47 ± 0,85	2,76 ± 0,89	0,041
FEV ₁ /FVC %	64,5 ± 7,3	70,2 ± 9,5	0,149
Pa _{O₂} , kPa	8,48 ± 1,15	8,59 ± 1,20	0,873

p Studentov t-test

4.4.2. Parametri oksidativnostresnog statusa kod pacijenata sa i bez IBS

Postojanje pojačanog oksidativnog stresa kod populacije pacijenata sa HOBP već je prikazano u prethodnim statističkim analizama. U ovom delu istraživanja hteli smo da ispitamo postojanje razlike u oksidativnom statusu i između podgrupa HOBP pacijenata u zavisnosti od prisustva IBS.

Vrednosti parametara oksidativnog stresa su više kod HOBP pacijenata sa IBS, ali razlika nije statistički značajna, uz napomenu da je kod TOS ta razlika na granici značajnosti. Takođe parametri antioksidativne zaštite kod podgrupe sa IBS imaju niže vrednosti, ali i ovde razlika nije statistički značajna. Rezultati analize prikazani su u Tabeli 14.

Tabela 14. Vrednosti parametara oksidativnostresnog statusa kod pacijenata sa i bez IBS

Parametar	HOBP pacijenti		p
	IBS +	IBS -	
O ₂ ⁻ , μmol/L	89,7 ± 21,1	84,2 ± 23,0	0,894
MDA, μmol/L	1,37 ± 0,44	1,28 ± 0,37	0,536
AOPP, μmol/L	59,1 ± 18,1	52,9 ± 13,5	0,292
TOS, mmol/L	17,23 ± 6,55	12,46 ± 5,34	0,056
SOD, U/L	17,1 ± 5,8	19,9 ± 7,8	0,292
POaza, U/L [#]	224 (144 - 350)	243 (158 - 373)	0,451 ^s
TAS, μmol/L	0,738 ± 0,289	0,849 ± 0,274	0,229
PAB, HKU	127 ± 46	128 ± 36	0,251

p Studentov t-test, ^s Mann-Whitney-ev test; [#] vrednosti predstavljene kao geometrijska sredina (25.-75. percentil)

4.4.3. Parametri inflamacije kod pacijenata sa i bez IBS

Prisustvo hronične inflamacije dokazano je prethodnim statističkim analizama. U ovom delu studije ispitana je razlika u vrednostima parametara inflamacije između grupa HOBP pacijenata sa i bez IBS. Pacijenti sa IBS imaju veću koncentraciju hsCRP i procenat neutrofila u odnosu na HOBP pacijente bez IBS, ali razlika nije statistički značajna. Rezultati analize prikazani su u Tabeli 15.

Tabela 15. Vrednosti parametara inflamacije kod pacijenata sa i bez IBS

Parametar	HOBP pacijenti		p
	IBS +	IBS -	
hsCRP, ng/ml [#]	3,89 (1,85 – 8,18)	1,98 (1,12 – 3,52)	0,099 ^s
Neutrofili, %	63,3 ± 8,9	61,5 ± 11,6	0,837

p Studentov t-test, ^s Mann-Whitney-ev test; [#] vrednosti predstavljene kao geometrijska sredina (25.-75. percentil)

4.4.4. Parametri proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa i bez IBS

Kao što je ranije pokazano, kod pacijenata sa HOBP postoji disbalans u proteaza/antiproteaza sistemu. Dalje je ispitano postojanje razlike u koncentracijama parametara proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa i bez IBS i dokazno je da grupa pacijenata sa IBS ima statistički značajno više vrednosti koncentracije TIMP1 u odnosu na pacijente bez IBS. Razlika u koncentracijama MMP9 i kompleksa MMP9-TIMP1 između grupa nije statistički značajna. Rezultati su prikazani u Tabeli 16.

Tabela 16. Vrednosti parametara proteaza/antiproteaza sistema kod pacijenata sa i bez IBS

Parametar	HOBP pacijenti		p
	IBS +	IBS -	
MMP9, ng/mL [#]	89.1 (60.9 ± 140.8)	85.1 (60.7 ± 107.3)	0.961
TIMP1, ng/mL	207 ± 18	142 ± 17	0.009^{\$}
Kompleks MMP9-TIMP1, ng/mL [#]	0.717 (0.366 – 1.530)	0.469 (0.177 – 1.245)	0.383

p Studentov t-test, ^{\$} Mann-Whitney-ev test; [#] vrednosti predstavljene kao geometrijska sredina (25.-75. percentil)

4.4.5. Lipidni status kod pacijenata sa i bez IBS

Za ispitivanje uticaja tradicionalnih faktora za razvoj KVB kod HOBP pacijenata određeni su parametri lipidnog statusa. Poređenjem dobijenih vrednosti u podgrupama sa i bez IBS nije dokazana statistički značajna razlika bez obzira na više vrednosti svih ispitivanih parametara u podgrupi sa IBS (Tabela 17).

Tabela 17. Vrednosti parametara lipidnog statusa kod pacijenata sa i bez IBS

Parametar	HOBP pacijenti		p
	IBS +	IBS -	
T-H, mmol/L	5,69 ± 0,94	5,64 ± 1,18	0,905
HDL-H, mmol/L	1,41 ± 0,27	1,61 ± 0,37	0,451
LDL-H, mmol/L	3,64 ± 1,16	3,43 ± 0,83	0,774
T-H/HDL-H odnos	4,05 ± 0,89	3,59 ± 0,62	0,885
LDL-H/HDL-H odnos	2,63 ± 0,78	2,26 ± 0,85	0,522
TG, mmol/L	1,21 ± 0,37	1,19 ± 0,55	0,741
Apo A1, g/L	1,58 ± 0,35	1,62 ± 0,37	0,782
Apo B, g/L	0,95 ± 0,34	0,94 ± 0,30	0,966

p Studentov t-test

4.5. Korelacija parametara respiratorne funkcije, inflamacije, oksidativnostresnog statusa i lipidnog statusa sa TIMP1 kao faktora rizika za razvoj IBS

Prethodnom statističkom analizom pokazano je da između pacijenata sa i bez IBS postoji značajna razlika samo u koncentraciji TIMP1, pa je daljom analizom ispitano da li u ove dve podgrupe postoji korelacija ovog parametra sa drugim ispitivanim parametrima.

Ispitivanjem korelacije između parametara respiratorne funkcije i TIMP1, u podgrupi HOBP pacijenata sa IBS dokazana je negativna korelacija sa P_{a,O_2} , dok je u podgrupi pacijenata bez IBS postoji korelacija sa % FVC.

Analizom korelacija parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa nivoom TIMP1 kod pacijenata sa i bez IBS dokazana je pozitivna korelacija sa TOS kod pacijenata sa IBS i pozitivna korelacija TIMP1 sa TAS kod pacijenata bez IBS.

Kod HOBP pacijenata sa IBS postoji korelacija između TIMP1 i procenta neutrofila, a u podgrupi pacijenata bez IBS nije dokazana nikakva korelacija između TIMP1 i

parametara inflamacije. Takođe, u obe podgrupe nema značajne korelacije između TIMP1 i parametara lipidnog statusa. Rezultati analize prikazani su u Tabeli 18.

Tabela 18. Korelacija vrednosti TIMP1 sa parametrima respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa, inflamacije, proteaza/antiproteaza sistema i lipidnog statusa kod HOBP pacijenata sa i bez IBS

Parametar	HOBP pacijenti	
	IBS +	IBS -
FEV ₁ , %	-0,179	0,324
FEV ₁ , L	0,041	0,035
FVC, %	0,025	0,512*
FVC, L	0,070	0,111
FEV ₁ /FVC %	-0,137	0,388
P _{a,O₂} , kPa	-0,868*	-0,098
O ₂ ⁻ , µmol/L	0,237	0,367
MDA, µmol/L	-0,317	-0,378
AOPP, µmol/L	0,114	0,097
TOS, µmol/L	0,501*	0,102
PO ₂ , U/L	0,340	0,124
TAS, µmol/L	0,232	0,550*
PAB, HKU	-0,026	-0,175
hs CRP, ng/ml	0,055	0,076
Neutrofili, %	0,806*	0,446
T-H, mmol/L	0,117	0,355
HDL-H, mmol/L	0,251	0,248
LDL-H, mmol/L	0,082	0,304
TG, mmol/L	0,129	0,044
Apo A1, g/L	0,142	0,412
Apo B, g/L	0,090	-0,231

*p<0.05; U tabeli su date vrednosti Spearman-ovog koeficijenta neparametarske korelacije

4.6. Logistička regresiona analiza uticaja ispitivanih parametara na razvoj IBS kod HOBP pacijenata

Jedan od ciljeva ove studije je ispitivanje potencijalne prediktorske moći parametara respiratorne funkcije, inflamacije, oksidativnog statusa i proteaza/antiproteaza sistema na razvoj IBS kod pacijenata sa HOBP. U tu svrhu korišćena je logistička regresiona analiza, u kojoj su podgrupe HOBP pacijenata sa IBS i bez IBS kodirane sa 1 i 0, a analiza je izvedena za svaki ispitivani parametar posebno, uzimajući u obzir uticaj pola, navike pušenja i godina.

Logistička regresiona analiza uticaja parametara respiratorne funkcije na razvoj IBS

Logističkom regresionom analizom parametara respiratorne funkcije dokazano je da najbolju prediktorsku moć na razvoj IBS ima smanjenje % FVC. Posle modifikacije vrednosti % FVC za pol, pušenje i godine starosti prediktorska moć se povećava. FEV₁ posle modifikovanja vrednosti za pol i godine postaje značajan prediktor. Prediktorska moć FEV₁/FVC odnosa postaje značajna nakon modifikovanja vrednosti za pušenje i godine, dok vrednosti P_{a,O_2} nemaju prediktorski značaj ni u jednom modelu. Rezultati ove analize prokazani su u Tabeli 19.

Tabela 19. Logistička regresiona analiza uticaja parametara respiratorne funkcije na razvoj IBS

Parametar	Nemodifikovani		Model 1 pol		Model 2 pušenje		Model 3 godine		Model 4 pol+pušenje+godine	
	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P
FEV₁, %	0,981 (0,948 – 1,014)	0,251	0,981 (0,948-1,016)	0,269	0,988 (0,951-1,027)	0,294	0,986 (0,944-1,029)	0,002	1,004 (0,948-1,065)	0,014
FEV₁, L	0,355 (0,105 – 1,201)	0,096	0,221 (0,046-1,052)	0,030	0,413 (0,114-1,493)	0,197	0,945 (0,169-5,278)	0,001	1,347 (0,099-8,330)	0,008
FVC, %	0,929 (0,879 – 0,981)	0,009	0,925 (0,872-0,982)	0,001	0,893 (0,818-0,987)	0,001	0,803 (0,625-1,030)	0,001	0,698 (0,449-0,887)	0,001
FVC, L	0,392 (0,157 – 0,978)	0,026	0,270 (0,085-0,862)	0,011	0,425 (0,164-1,101)	0,096	0,653 (0,201-2,119)	0,001	0,523 (0,112-2,445)	0,006
FEV₁/FVC %	1,039 (0,985 – 1,096)	0,132	1,040 (0,981-1,103)	0,142	1,085 (1,007-1,169)	0,032	1,046 (0,969-1,128)	0,001	1,282 (0,976-1,685)	0,001
Pa_{o2}, kPa	0,917 (0,349 – 2,409)	0,863	0,901 (0,311-2,123)	0,721	1,397 (0,425-4,595)	0,287	0,821 (0,228-3,112)	0,183	0,852 (0,321-3,225)	0,211

OR= eng.Odd ratio; IP= interval pouzdanosti

Model 1, ispitivani parametar modifikovan za pol

Model 2, ispitivani parametar modifikovan za pušenje

Model 3, ispitivani parametar modifikovan za godine starosti

Model 4, ispitivani parametar modifikovan za pol, pušenje i godine starosti

Logistička regresiona analiza uticaja parametara oksidativnostresnog statusa na razvoj IBS

U logističkoj regresionoj analizi uticaja parametara oksidativnostresnog statusa na razvoj IBS, najveća prediktorska moć dokazana je za TOS. Nakon modifikovanja vrednosti parametara oksidativnostresnog statusa za pol i pušenje, nijedan parametar ne pokazuje prediktorsku moć na razvoj IBS. Međutim, modifikovanjem vrednosti ovih parametara za godine starosti, prediktorska moć se značajno povećava. Rezultati analize prikazani su u Tabeli 20.

Tabela 20. Logistička regresiona analiza uticaja parametara oksidativnostresnog stratusa na razvoj IBS

Parametar	Nemodifikovani		Model 1 pol		Model 2 pušenje		Model 3 godine		Model 4 pol+pušenje+godine	
	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P
O₂⁻, μmol/L	1,004 (0,977 – 1,031)	0,765	1,008 (0,979-1,037)	0,421	1,007 (0,976-1,039)	0,313	0,998 (0,965-1,034)	0,002	1,010 (0,967-1,055)	0,013
MDA, μmol/L	0,576 (0,107 – 3,092)	0,517	0,647 (0,115-3,647)	0,434	0,629 (0,105-3,761)	0,305	0,814 (0,103-6,416)	0,002	1,102 (0,117-10,384)	0,014
AOPP, μmol/L	1,007 (0,960 – 1,056)	0,769	0,998 (0,949-1,050)	0,489	0,985 (0,933-1,040)	0,301	1,013 (0,957-1,072)	0,002	0,988 (0,921-1,061)	0,014
TOS, mmol/L	0,878 (0,761 – 1,012)	0,043	0,889 (0,772-1,081)	0,081	0,902 (0,777-1,046)	0,138	0,870 (0,712-1,062)	0,001	0,903 (0,720-1,132)	0,010
SOD, U/L	0,940 (0,840 – 1,052)	0,270	0,943 (0,842-1,057)	0,287	0,939 (0,834-1,057)	0,214	0,968 (0,843-1,111)	0,002	0,954 (0,815-1,116)	0,013
POaza, U/L	0,998 (0,993 – 1,003)	0,436	0,997 (0,992-1,003)	0,488	0,998 (0,993-1,004)	0,132	0,997 (0,990-1,004)	0,008	0,997 (0,989-1,006)	0,039
TAS, μmol/L	0,955 (0,905 – 1,201)	0,196	5,424 (0,215-36,807)	0,281	8,632 (0,239-2,388)	0,180	1,987 (0,044-89,373)	0,002	1,867 (0,020-174,209)	0,014
PAB, HKU	0,998 (0,994 – 1,002)	0,665	0,998 (0,994-1,002)	0,319	0,999 (0,995-1,003)	0,320	0,996 (0,990-1,001)	0,001	0,997 (0,992-1,004)	0,011

OR= eng. Odd ratio; IP= interval pouzdanosti

Model 1, ispitivani parametar modifikovan za pol;

Model 3, ispitivani parametar modifikovan za godine starosti

Model 2, ispitivani parametar modifikovan za pušenje;

Model 4, ispitivani parametar modifikovan za pol, pušenje i godine starosti

Logistička regresiona analiza uticaja parametara inflamacije na razvoj IBS

Logističkom regresionom analizom pokazano je i da hsCRP ima bolju prediktorsku moć za razvoj IBS od % neutrofila, ali ipak bez statističkog značaja. Modifikovanjem vrednosti parametara inflamacije za pol i pušenje njihova prediktorska moć nema značaja, dok modifikovanjem vrednosti za godine starosti i hsCRP i % neutrofila dobijaju statistički značajnu prediktorsku moć na razvoj IBS. Rezultati analize prikazani su u Tabeli 21.

Tabela 21. Logistička regresiona analiza uticaja parametara inflamacije na razvoj IBS

Parametar	Nemodifikovani		Model 1 pol		Model 2 pušenje		Model 3 godine		Model 4 pol+pušenje+godine	
	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p	OR (95% IP)	p
hsCRP, ng/ml	1,111 (0,971- 1,270)	0,080	1,120 (0,972-1,291)	0,124	1,127 (0,979-1,296)	0,106	1,126 (0,931-1,362)	0,001	1,115 (0,914-1,360)	0,004
Neutrofili, %	1,011 (0,916-1,116)	0,822	1,011 (0,916-1,116)	0,954	1,004 (0,905-1,115)	0,934	0,866 (0,687-1,093)	0,010	0,718 (0,351-1,467)	0,032

OR= eng.Odd ratio; IP= interval pouzdanosti

Model 1, ispitivani parametar modifikovan za pol

Model 2, ispitivani parametar modifikovan za pušenje

Model 3, ispitivani parametar modifikovan za godine starosti

Model 4, ispitivani parametar modifikovan za pol, pušenje i godine starosti

Logistička regresiona analiza uticaja parametara proteaza/antiproteaza sistema na razvoj IBS

Logistička regresiona analiza uticaja parametara proteaza/antiproteaza sistema za razvoj IBS pokazala je da visoku prediktivnu moć ima TIMP1. Modifikovanjem ovih vrednosti u sva tri modela, TIMP1 zadržava prediktorsku moć. MMP9 vrednosti modifikovane za pušenje, kao i godine starosti postaje značajan prediktor za razvoj IBS. Kompleks MMP9-TIMP1 postaje značajan prediktor samo u modelu 3, nakon modifikovanja vrednosti za godine starosti. Rezultati logistička regresiona analize prikazani su u Tabeli 22.

Logistička regresiona analiza uticaja lipidnog statusa na razvoj IBS

Prediktorska moć parametara lipidnog statusa na razvoj IBS kod HOBP pacijenata nema statističkog značaja. Međutim, nakon modifikovanja vrednosti za godine starosti, prediktorska moć svih parametara lipidnog statusa postaje statistički značajna. Rezultati su prikazani u Tabeli 23.

Tabela 22. Logistička regresiona analiza uticaja parametara proteaza/antiproteaza sistema na razvoj IBS

Parametar	Nemodifikovani		Model 1 pol		Model 2 pušenje		Model 3 godine		Model 4 pol+pušenje+godine	
	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P
MMP9, ng/mL	0,998 (0,988 -1,008)	0,732	0,995 (0,983-1,007)	0,476	0,993 (0,977-1,010)	0,013	1,010 (0,988-1,033)	0,001	0,795 (0,132-2,012)	0,001
TIMP1, ng/mL	1,023 (1,002-1,044)	0,007	1,022 (1,002-1,044)	0,027	1,052 (0,975-1,136)	0,001	1,012 (0,987-1,038)	0,001	0,837 (0,665-0,923)	0,001
Kompleks MMP9- TIMP1, ng/mL	1,101 (0,706-1,716)	0,665	1,087 (0,695-1,700)	0,873	1,213 (0,758-1,832)	0,733	1,443 (0,450-4,630)	0,003	1,324 (0,489-4,132)	0,002

OR= eng.Odd ratio; IP= interval pouzdanosti

Model 1, ispitivani parametar modifikovan za pol

Model 3, ispitivani parametar modifikovan za godine starosti

Model 2, ispitivani parametar modifikovan za pušenje

Model 4, ispitivani parametar modifikovan za pol, pušenje i godine starosti

Tabela 23. Logistička regresiona analiza uticaja lipidnog statusa na razvoj IBS

Parametar	Nemodifikovani		Model 1 pol		Model 2 pušenje		Model 3 godine		Model 4 pol+pušenje+godine	
	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P	OR (95% IP)	P
T-H, mmol/L	0,953 (0,452-2,010)	0,900	0,956 (0,443-2,060)	0,455	0,653 (0,262-1,629)	0,391	1,068 (0,406-2,811)	0,005	0,747 (0,214-2,613)	0,030
HDL-H, mmol/L	0,128 (0,008-2,033)	0,111	0,204 (0,011-3,841)	0,189	0,038 (0,001-1,709)	0,070	0,134 (0,004-4,791)	0,005	0,040 (0,001-5,985)	0,023
LDL-H, mmol/L	1,176 (0,492-2,089)	0,714	1,117 (0,451-2,767)	0,342	0,704 (0,242-2,048)	0,290	1,545 (0,406-3,281)	0,009	0,754 (0,208-2,741)	0,044
TG, mmol/L	1,023 (0,228-4,619)	0,977	0,793 (0,163-3,839)	0,439	0,651 (0,126-3,356)	0,494	2,190 (0,376-12,768)	0,003	1,591 (0,207-12,240)	0,030
Apo A1, g/L	0,706 (0,068-7,322)	0,770	1,043 (,085-12,778)	0,498	0,466 (0,025-8,798)	0,315	1,426 (0,048-42,554)	0,003	0,275 (0,002-42,759)	0,016
Apo B, g/L	1,063 (0,078-14,485)	0,934	0,942 (0,064-13,903)	0,497	0,328 (0,014-7,523)	0,287	0,933 (0,028-31,131)	0,003	0,123 (0,001-12,246)	0,012

OR= eng.Odd ratio; IP= interval pouzdanosti

Model 1, ispitivani parametar modifikovan za pol

Model 3, ispitivani parametar modifikovan za godine starosti

Model 2, ispitivani parametar modifikovan za pušenje

Model 4, ispitivani parametar modifikovan za pol, pušenje i godine starost

4.7. Analiza uticaja parametara respiratorne funkcije, oksidativnostresnog statusa i inflamacije na prediktivnu moć TIMP1

Nakon što je logističkom regresionom analizom dokazano da TIMP1 ima najbolju prediktivnu moć za procenu rizika za razvoj IBS, analiza je ponovljena dodavanjem drugih parametara, poznatih faktora rizika za nastanak IBS. Na taj način formirano je pet modela, gde prva tri daju rezultate za TIMP1 i pojedinačne faktore rizika (FEV_1 , hsCRP, TOS), Model 4 objedinjuje inflamaciju i oksidativni stres (hsCRP i TOS), a Model 5 pridružuje i oslabljenu respiratornu funkciju (FEV_1). Dijagnostička tačnost upotrebe ovih parametara proveravana je korišćenjem Receiver Operating Characteristics (ROC) krivih. Površina ispod krive bila je mera tačnosti ispitivanih parametara u identifikovanju pojedinaca sa povećanim rizikom za razvoj komorbiditeta. Istovremeno je ovakvom analizom podataka dobijena i vrednost tačno klasifikovanih bolesnika po grupama u zavisnosti od prisustva IBS kao komorbiditeta među HOBP pacijentima.

Analizom ROC krivih može se uočiti da sve krive zadovoljavaju Hasmer-ove i Lemeshow-e kriterijume, odnosno AUC ispod krivih su statistički značajno veće od 0,5. AUC za TIMP1 iznosi 0,812 čime se ukazuje na odličnu prediktorsku moć ovog parametra (Tabela 24).

Prediktivna moć TIMP1 ostaje značajna u svim modelima. Najznačajniji je Model 5 u kome su se pokazalo da TIMP1 zadržava prediktivni značaj za razvoj IBS sa uticajem i ranije poznatih faktora rizika. Na osnovu ovih rezultata postavlja se pitanje da li je TIMP1 novi faktor rizika za razvoj IBS kod HOBP pacijenata.

Kada se TIMP1 posmatra kao parametar za razdvajanje pacijenata sa IBS od pacijenata bez IBS, dobija se 72,22% tačno klasifikovanih pacijenata. Dodatkom drugih faktora rizika raste procent tačno klasifikovanih pacijenata. Model 5 koji predstavlja udruženi efekat svih poznatih faktora rizika, inflamacije, oksidativnog stresa i smanjene respiratorne funkcije, koji su dodati TIMP1, pokazuje najbolji dijagnostički značaj (AUC=0,964) i najveći procenat tačno klasifikovanih pacijenata (86,67%) u zavisnosti od toga da li imaju IBS ili ne. Rezultati ovog ispitivanja prikazan je u Tabeli 24.

Tabela 24. Logistička regresiona analiza udruženog uticaja parametara za razvoj IBS

Parametar	OR (95% IP)	AUC	% Tačno klasifikovanih	p
TIMP1	1,023 (1,002-1,044)	0,812	72,22	0,007
Model 1: TIMP1+%FEV ₁	1,021 (0,999 – 1,044)	0,800	77,78	0,001
Model 2: TIMP1+hsCRP	1,024 (0,997 – 1,052)	0,893	80,00	0,014
Model 3: TIMP1+TOS	1,039 (1,001 – 1,078)	0,937	77,78	0,001
Model 4: TIMP1+hsCRP+TOS	1,045 (0,995 – 1,097)	0,946	86,67	0,004
Model 5: TIMP1+hsCRP+TOS+%FEV ₁	1,074 (0,955 – 1,209)	0,964	86,67	0,006

p logistička regresiona analiza; OR= *eng.* odd ratio; IP= interval pouzdanosti; AUC= *eng.* area under curve

5. DISKUSIJA

Hronična opstruktivna bolest pluća je bolest koju karakteriše ograničeni protok vazduha, a kao posledica specifičnih strukturalnih abnormalnosti nastalih u disajnim putevima i plućnom parenhimu (1). Ove strukturalne promene u plućima nastaju kao posledica hronične inflamacije, praćene oksidativnim stresom i proteolizom ekstracelularnog matriksa (11). Klasifikacija težine bolesti (GOLD) zasniva se primarno na testovima plućne funkcije, vrednostima forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) i forsiranog ekspirijumskog volumena ostvarenog u prvoj sekundi (FEV_1). Kao glavni faktor rizika za razvoj ove bolesti navodi se pušenje. Pored pušenja faktori iz spoljašnje sredine, kao što su čestice aerozagađenja i radnog okruženja takođe imaju uticaja na razvoj ove bolesti. Interakcijom spoljašnjih i unutrašnjih faktora nastaju patofiziološke karakteristike HOBP. Bolest takođe karakterišu i povremena pogoršanje opšteg stanja pacijenata, stanja egzacerbacije. Učestalost egzacerbacija utiče na stadijum težine bolesti i prognozu bolesti (55).

Jedan od ciljeva naše studije bio je upravo praćenje respiratorne funkcije, oksidativnog stresa, inflamacije i proteaza/antiproteza sistema u različitim stadijumima bolesti i njihovo poređenje sa zdravom populacijom. Rezultati studije su pokazali da se respiratorna funkcija poboljšava tokom hospitalizacije i nadalje do kontrolnog pregleda, sa istovremenih smanjenjem hipooksigenacije (Tabela 2).

Izloženost pluća oksidansima je konstantna, bilo egzogenog (pušenje, aerozagađenje) ili endogenog porekla (aktivirane makrofage i neutrofili). Pluća se štite od štetnog uticaja oksidanasa dobro razvijenim enzimskim i neenzimskim antioksidativnim sistemima (56). Kada se naruši balans između oksidanasa i antioksidativne zaštite nastaje oksidativni stres. Brojne studije ukazale su na pojačan oksidativni stres u plućima pacijenata sa HOBP u poređenju sa zdravima, ali istovremeno i sa pušačima slične istorije pušenja kod kojih sa nije razvila HOBP (57,58,59). U izdahnutom vazduhu pacijenata sa HOBP izmeren je povećan nivo vodonik-peroksida, za koji se smatra da delimično potiče i od superoksidnog anjona iz aktiviranih makrofaga u plućima (60). Neutrofili iz periferne cirkulacije kod HOBP pacijenata takođe oslobađaju veći nivo superoksidnog anjona, naročito u stanju egzacerbacije. Povećani nivo oksidanasa povećava i nivo proizvoda oksidacije. Proizvodi

lipidne peroksidacije, kao što su malodialdehid i drugi toksični aldehidi, prisutni su u sputumu HOBP pacijena u većim koncentracijama u odnosu na zdrave i istovremeno su u negativnoj korelaciji sa respiratornom funkcijom (28). Dokazano je da istovremeno sa povećanjem nivoa oksidanasa, antioksidativna zaštita opada kod pacijenata sa HOBP. MacNee je dokazao sniženi nivo ukupnog antioksidativnog kapaciteta kod HOBP pacijenata, naročito izraženim u stanju egzacerbacije (8).

U našoj studiji, visok nivo superoksidnog anjona u perifernoj cirkulaciji pacijenata nastavlja da raste i nakon egzacerbacije, u narednih 7 dana kliničkog lečenja, a zatim opada sa stabilizacijom stanja, mada još uvek ostaje na znatno višem nivou u odnosu na kontrolnu grupu. Poreklo superoksidnog anjona kod HOBP pacijenata je uglavnom iz aktiviranih neutrofila u parenhimu pluća i perifernoj cirkulaciji (5). Povećani nivo oksidanasa posledično prati i povećani nivo proizvoda lipidne peroksidacije (MDA) i oksidacije proteina (AOPP), (Tabela 3). Ukupni oksidativni status, TOS u čiji sastav ulaze peroksidi i lipidni hidroperoksidi, pokazuje isti trend promene kao i ranije pomenuti parametri oksidativnog stresa (Tabela 3). Nasuprot ovome, enzimi antioksidativne zaštite, SOD i POaza pokazuju znatno sniženu aktivnost u odnosu na zdrave. MacNee ukazuje da HOBP pacijenate karakteriše smanjeni nivo antioksidativne zaštite kao posledica uticaja brojnih faktora inflamacije kao i proizvoda oksidacije na regulaciju sinteze enzima sa antioksidativnim dejstvom (60). Niži nivo aktivnosti SOD, može biti posledica i „trošenja“ ovog enzima usled konstantne izloženosti visokom nivou superoksidnog anjona (5). Sniženi nivo aktivnosti i smanjena genska ekspresija PON1 kod hroničnih bolesti pluća već je dokazana u studiji na ispitanicima sa astmom, naročito u stanju egzacerbacije, što je u skladu sa rezultatima naše studije (11). Smanjeni nivo ukupnog antioksidativnog statusa, TAS koji uključuje neenzimske antioksidanse u krvi (bilirubin, proteine, vitamin C), u skladu je sa rezultatima studije Rahmana i saradnika (61). Međutim, nije dokazana korelacija između TAS sa respiratornom funkcijom (FEV_1 ili FEV_1/FVC odnosom). Ovakav nalaz potvrđen je i u studiji Hagemana i saradnika, gde je znatno niži TAS u plazmi kao i nivo mokraćne kiseline zabeležen kod HOBP pacijenata u odnosu na zdrave (62). Ovakav rezultat direktna je posledica ne samo smanjenja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite već i ostalih neenzimskih antioksidanasa čiji ukupni nivo odlikava koncentracija TAS. U našoj studiji prooksidativni/antioksidativni balans, PAB je koristio kao parametar koji ukazuje na odnos ukupnog oksidativnog i antioksidativnog kapaciteta. Povećani nivo PAB je potvrda

izraženijeg oksidativnog stresa u odnosu na antioksidativni odgovor organizma, naročito tokom egzacerbacija. PAB se kao parametar oksidativnog statusa pominje u studijama koje se bave drugim patologijama, kao što su kardiovaskularne bolesti (63,64), i respiratornog distres sindroma (65), za koje je karakterističan pojačani oksidativni stres, takođe je dokazan njegov povećan nivo. Kod HOBP povećan nivo PAB dokazan je u našoj predhodnoj studiji čiji je cilj bio ispitivanje promene oksidativnostresnog statusa među HOBP pacijentima u toku hospitalizacije (66).

Razvoj intenzivnog oksidativnog stresa u plućima oštećuje plućno tkivo utičući na nivo opstrukcije disajnih puteva. Produkti peroksidacije nastaju pod uticajem superoksidnog anjona i vodonok peroksida, oslobođenih iz aktiviranih neutrofila i alveolarnih makrofaga (67,68). S obzirom da je u alveolarnim makrofagama pušača povećan i nivo gvožđa u odnosu na nepušače, oslobođeno slobodno gvožđe u disajnim putevima može stimulisati nastanak ROS preko Fankoni reakcije (69). Još jedan izvor superoksidnog anjona i vodonik peroksida je i enzimski reakcija ksantin-oksidade. Povećana aktivnost ovog enzima zabeležena je u sputumu, ali i perifernij cirkulaciji HOBP pacijenata u odnosu na zdrave i nepušače (70). Nivo proizvoda peroksidacije arahidonske kiseline, 8-izoprostan u izdahnutom vazduhu kod HOBP pacijenata u pozitivnoj je korelaciji sa procentom neutrofila u sputumu, ukazujući na ulogu oksidativnog stresa u nastanku oštećenja plućnog parenhima (71). Takođe, nivo 8-izoprostana u urinu viši je kod HOBP pacijenata u odnosu na zdrave i njegov se nivo povećava tokom egzacerbacija (72). Količina produkata lipidne peroksidacije, tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci je povećana u sputumu pacijenata sa HOBP i u negativnoj korelaciji sa FEV₁ vrednostima (7). Rezultati naše studije ukazuju na negativnu korelaciju između AOPP i FEV₁/FVC odnosa u stanju egzacerbacije, dok je u stabilnom stanju AOPP u negativnoj korelaciji sa FEV₁ i FVC. Takođe visok nivo superoksidnog anjona u stanju egzacerbacije prate sniženi FEV₁ i FEV₁/FVC odnos. Povišeni totalni oksidativni status pacijenata u stanju egzacerbacije prati opadanje respiratorne funkcije, sa najizraženijim smanjenjem FVC (Tabela 6).

Dobro je poznata i u mnogim studijama dokazana i povezanost oksidativnog stresa i inflamacije, kao njihovo međusobno potenciranje. Proizvodi lipidne peroksidacije, kao što je 8-izoprostan može delovati kao signalni molekul i dovesti do oslobađanja medijatora inflamacije, kao što je IL-8 iz ćelija pluća (73). Takođe, proizvod lipidne peroksidacije 4-

HNE može usloviti pojačanu sintezu transformišućeg faktora rasta- β (TGF- β) (74). Oksidativni stres ispoljava ključnu ulogu u pojačanju inflamacije pre svega preko uticaja na regulaciju transkripcionog faktora, nuklearnog faktora κ B (NF- κ B). Geni mnogobrojnih inflamatornih molekula regulisani su upravo NK- κ B (75). Dokazano je da oksidansi u alveolarnim i bronhijalnim epitelnim ćelijama oslobađaju inflamatorne medijatore kao što je IL-8, IL-1 i da je ova pojava direktna posledica pojačane ekspresije gena za njihovu sintezu, koji su pod kontrolom NK- κ B (76). U našoj studiji ispitivanjem korelacije između parametara oksidativno stresnog statusa i inflamacije, dokazana je negativna korelacija između PAB i hsCRP kod prijema pacijenata na kliničko lečenje (Tabela 7).

Hronična inflamacija jedna je od osnovnih karakteristika HOBP, a posebno je izražena tokom egzacerbacije (77). U našoj studiji je pojačana inflamacija dokazana visokim koncentracijama hsCRP, naročito u stanju egzacerbacije. Pod uticajem antiinflamatorne terapije, tj. kortikosteroida, koncentracija hsCRP smanjuje se u toku bolničkog lečenja na nivo koji je i dalje znatno viši u odnosu na zdrave osobe. Stabilizacija bolesti nije dovela do značajnijeg pada koncentracije hsCRP, što ukazuje na postojanje hronične inflamacije kod HOBP pacijenata (Tabela 4). Sin i saradnici dokazali su takođe povećani nivo hsCRP kod HOBP pacijenata u stabilnom stanju (78). Man i saradnici (79) su u svojoj studiji ukazali da se kod HOBP pacijenta sa povećanjem koncentracije hsCRP povećava rizik od smrtnog ishoda. Slične rezultate pokazali su Dahle i saradnici, gde je CRP predstavljen kao nezavisni prediktor prognoze bolesti, izražene kroz broj hospitalizacija i smrtnog ishoda (80). Neutrofili su takođe značajni markeri inflamacije kod HOBP pacijenata. Povećani procenat neutrofila u sputumu kod HOBP pacijenata linearan je sa povećanjem koncentracije IL-8, koji je odgovoran za pojačani influks neutrofila u tkivo disajnih puteva, kako kod stabilnih pacijenata, tako i u egzacerbaciji HOBP (81). Neutrofilija prisutna kod HOBP pacijenata tokom egzacerbacija, dokazana je i u našoj studiji. Imajući u vidu da su neutrofili kod HOBP pacijenata glavni izvor superoksidnog anjona i posledično oksidativnog stresa sa jedne, i pojačane genske ekspresije brojnih medijatora inflamacije sa druge strane, može se zaključiti da je neutrofilija dodirna tačka oksidativnog stresa i inflamacije kod HOBP. Prethodne studije ukazale su na korelaciju između broja neutrofila i parametara respiratorne funkcije, kao i broja neutrofila i opstrukcije disajnih puteva (82). U našoj studiji dokazana je neutrofilija u stanju egzacerbacije koja se smanjuje u toku bolničkog lečenja i dalje stabilizacijom bolesti. Povezanost respiratorne funkcije sa brojem neutrofila u perifernoj

cirkulaciji dokazana je i u našoj studiji negativnom korelacijom između FEV₁ i procenta neutrofila u stabilnom stanju (Tabela 6).

Reaktivne kiseonične grupe oslobođene iz aktiviranih neutrofila reaguju sa brojnim proteazama i antiproteazama, dovodeći do disbalansa u njihovom odnosu (13). To se pre svega ispoljava inaktivacijom endogenih antiproteaza u plućima. Matriks metaloproteinaze su značajni učesnici u razgradnji tkivnog matriksa pluća, pa je disbalans sa njihovim inhibitorima značajan faktor u samoj patogenezi HOBP. Pod uticajem brojnih faktora, mnoge ćelije u plućima, uključujući bronhijalne epitelne ćelije, Klara ćelije, endotelne ćelije proizvode MMP9 (83). Pinto-Plata i saradnici pokazali su da HOBP pacijenti imaju više koncentracije MMP9 i TIMP1 u cirkulaciji u odnosu na zdrave i da je istovremeno nivo MMP9 u značajnoj korelaciji sa frekvencom egzacerbacija (84). Takođe, povećane koncentracije MMP9 prisutne i u stabilnom stanju, dovode se u vezu sa pojačanom inflamacijom kod HOBP (85). U ovoj studiji nivo MMP9 znatno je viši u odnosu na zdrave u svim stadijumima praćenja HOBP pacijenata. Porast koncentracije MMP9 u stanju egzacerbacije u odnosu na stabilno stanje prati neznatno smanjenje koncentracije TIMP1, verovatno kao posledica hroničnog karaktera ove bolesti (Tabela 5). Koncentracija kompleksa MMP9-TIMP1 kod HOBP pacijenata u klinički stabilnom stanju neznatno se razlikuje od koncentracije kod zdravih ispitanika. Međutim, značajan skok koncentracije ovog kompleksa može da ukaže upravo na pojačanu proteolitičku aktivnost tokom akutizacije bolesti. Prema dostupnim podacima nivo MMP9-TIMP1 kompleksa nije određivan u drugim studijama koje su se bavile ispitivanjem proteaza i njihovih inhibitora u populaciji pacijenata sa HOBP.

Uticaj disbalansa proteaza/antiproteaza sistema na nivo respiratorne funkcije u našoj studiji potvrđen je negativnom korelacijom između nivoa TIMP1 i FEV₁ i FVC u stabilnom stanju. Interakcija oksidativnog stresa i proteolize u našoj studiji potvrđena je pozitivnom korelacijom između koncentracije proizvoda oksidacije, AOPP i aktivnosti MMP9 i TIMP1 i koncentracijom kompleksa u stanju egzacerbacije. Potvrdu ovakve teze daje i pozitivna korelacija između TOS i aktivnosti MMP9 i TIMP1 kako u stabilnom stanju, tako i tokom akutizacije bolesti. TOS je u pozitivnoj korelaciji i sa kompleksom u stabilnom stanju (Tabela 7). Superoksid-dismutaza, kao glavni enzim antioksidativne zaštite, pak pokazuje negativnu korelaciju sa aktivnošću MMP9 i TIMP1 i koncentracijom kompleksa u stanju

egzacerbacije. Stabilizacijom bolesti ova korelacija se gubi u odnosu na MMP9 i TIMP1, dok u odnosu na koncentraciju kompleksa postaje pozitivna (Tabela 7). Ovakav rezultat potvrđuje tezu da je antioksidativna zaštita SOD istrošena hroničnim uticajem visokih koncentracija superoksidnog anjona, i da ne prati povećanje ne samo oksidativnog stresa već i proteolitičke aktivnosti.

Povezanost proteolitičke aktivnosti i inflamacije u našoj studiji dokazana je pozitivnom korelacijom između aktivnosti MMP9 i procenta neutrofila u stabilnom stanju i aktivnošću TIMP1 i koncentracije hsCRP u egzacerbaciji. Izražena pozitivna korelacija između koncentracije formiranog kompleksa MMP9-TIMP1 i procenta neutrofila u akutnom ali i stabilnom stanju bolesti može da ukaže na glavni izvor ovih proteaza i antiproteaza kod HOBP pacijenata (Tabela 8).

5.1. Promena resorpcije koštanog tkiva kod HOBP pacijenata

Osteoporoza je sistemska bolest skeletnog sistema, koja dovodi do povećanja krтости i rizika od lomljenja kostiju. Osteoporoza može biti primarna, postmenopauzalna ili staračka i sekundarna koja se javlja kao posledica hroničnih bolesti, terapije određenim lekovima ili načina života. Poslenjih par decenija poseban značaj pridaje se sekundarnoj osteoporozi, prisutnoj kod različitih patogenih stanja (34).

Koštano tkivo je složeno, sastavljeno iz organskog ekstracelularnog matriksa koji je popunjen mineralima. Koštani matriks se sastoji iz kolagena tipa 1, proteoglikana i velikog broja nekolagenih proteina (osteopontin, osteokalcin, fibronektin). Mineral u kostima u najvećem procentu je kalcijum hidroksiapatit. Koštani sistem se stalno obnavlja procesom remodeliranja kostiju. Fiziološki proces remodeliranja predstavlja balans između formiranja koštanog tkiva i aktivnošću osteoblasta i resorpcije kostiju i aktivnošću osteoklasta. U normalnim uslovima resorpcija je uvek praćena formiranjem kostiju. U toku procesa remodeliranja dolazi do oslobađanja određene frakcije specifičnih proteina iz koštanog tkiva u cirkulaciju. Određivanjem koncentracije ovih proteina u sistemske cirkulaciji određuje se intenzitet procesa resorpcije i formiranja koštanog tkiva, kao i njihove ravnoteže (86).

Merenje gustine koštanog tkiva, BMD (*eng.* bone mineral density) predstavlja zlatni standard u dijagnozi osteoporoze. Za ovo merenje koristi se dvostruko energetska

apsorpciometrija X-zraka, DEXA (eng. dual-energy X-ray absorptiometry). Vrednost BMD kod pacijenata predstavlja se na dva načina: 1) u odnosu na zdrave istih godina (T vrednost); i 2) u odnosu na zdrave istog pola i starosti (Z vrednost). Razlika u odnosu na zdrave izražava se kroz broj standardnih devijacija. Svetska zdravstvena organizacije definiše dijagnozu osteoporoze za T vrednosti $\geq 2,5$ i osteopeniju za T između 1 i 2,5.

Osteoporoza je prepoznata kao jedna od posledica sistemskih efekata HOBP. Tačan mehanizam koji povezuje ove bolesti još uvek sa sigurnošću nije utvrđen. Etiologija osteoporoze kod HOBP je kompleksna i uključuje brojne faktore. Neki od faktora koji utiču na pojavu osteoporoze kod ovih pacijenata su ujedno i posledica same bolesti pluća, kao što je redukovana respiratorna funkcija i posledično smanjena fizička aktivnost, smanjena masa skeletnih mišića, zatim kortikosteroidna terapija i hormonalni status, tj. hipogonadizam prirodno prisutan u starosnom dobu koje je karakteristično za ove pacijente. Prevalenca osteoporoze kod HOBP je visoka. Biskobing je objavio da 35-72% pacijenata ima osteopeniju, dok 35-60% osteoporozu (39). Slične rezultate objavili su i Engelen i saradnici (86): 36% sa osteopenijom i 11% sa osteoporozom. Učestalost osteoporoze kod HOBP raste zajedno sa težinom HOBP, pa je kod 75% pacijenata u III stadijumu bolesti imalo i osteoporozu (87).

Cilj naše studije bio je dokazivanje postojanja hronične pojačane resorpcije koštanog tkiva kod HOBP pacijenata, što bi za posledicu imalo i pojavu osteoporoze. Takođe je ispitan i uticaj redukovane respiratorne funkcije, inflamacije, oksidativnog stresa i proteaza/antiproteaza sistema na nivo beta-CL, marker resorpcije koštanog tkiva.

Disfunkcija u remodeliranju koštanog tkiva kod HOBP uzrokovana je brojnim biohemijskim i imunološkim poremećajima, lokalno u plućnom tkivu i sistemski. Medijatori hronične inflamacije (interleukini i faktor tumorske nekroze- α) mogu čak četiri puta povećati resorpciju koštanog tkiva posredovanu osteoklastima (88). Sa druge strane oksidativni stres karakterističan za HOBP može aktivirati pro-inflamatorne gene, ali i dovesti do disbalansa u proteaze/antiproteaza sistemu inaktivirajući antiproteaze i aktiviranjem metaloproteinaza (6). Matriks metaloproteinaze imaju bitnu regulatornu ulogu u remodeliranju koštanog tkiva. Matriks metaloproteinaza-9 je primer metaloproteinaze koja svojom aktivnošću direktno aktivira osteoklaste i proces resorpcije (89).

U našoj studiji dokazano je prisustvo povećanih koncentracija beta-CL u cirkulaciji kod HOBP pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike. Ovakvi rezultati u skladu su sa prethodnim studijama (90). Nivo beta-CL značajno se povećava u toku egzacerbacije (Tabela 9). S obzirom da egzacerbaciju karakterišu ne samo pogoršanje respiratorne funkcije, već i pojačanje inflamacije, oksidativnog stresa i disbalansa proteaza/antiproteaza sistema, što je u prethodnom delu i prikazano, logičan nastavak našeg istraživanja bilo je ispitivanje korelacije između nivoa markera resorpcije koštanog tkiva i ostalih ispitivanih parametara.

Prethodne studije ukazale su na povezanost između opadanja respiratorne funkcije praćene hipoksijom i broja HOBP egzacerbacija sa smanjenjem gustine koštanog tkiva (9). U našoj studiji nije dokazana korelacija ni sa jednim parametrom respiratorne funkcije, kako u stanju egzacerbacije tako i u stabilnom stanju (Tabela 10).

Ranije je dokazano da sistemska inflamacija može biti od velikog značaja u progresiji osteoporoze kod HOBP pacijenata. Mehanizam kojim hronična inflamacija dovodi do povećanja rizika od osteoporoze još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Mundy je u svojoj studiji dokazao da pojačanu produkciju proinflamatornih citokina kao što su IL-1, TNF- α i IL-6 često prati pojačana resorpcija kostiju, a kao posledica njihovog uticaja na aktivaciju osteoklasta (91). U našoj studiji dokazana je pozitivna korelacija između koncentracija hsCRP i beta-CL u klinički stabilnom stanju pacijenata, upućujući na zaključak da hronična inflamacija znatno utiče na resorpciju koštanog tkiva (Tabela 10).

Oksidativni stres jedan je od mehanizama za pojačanje inflamacije kod HOBP. Dokazano je da proizvodi lipidne peroksidacije deluju kao signalni molekuli koji dovode do pojačanog oslobađanja inflamatornih medijatora. Ovi inflamatorni medijatori dalje pojačavaju gensku ekspresiju drugih inflamatornih markera. Pojačanu inflamaciju uvek prati i pojačanje oksidativnog stresa (8). U našoj studiji je u stanju egzacerbacije dokazana pozitivna korelacija između koncentracija produkta lipidne peroksidacije, MDA i markera resorpcije koštanog tkiva, beta-CL. Sa druge strane, da i smanjenje antioksidativne zaštite kod HOBP može uticati na resorpciju koštanog tkiva, dokazano je u našoj studiji negativnom korelacijom između paraoksonaze i beta-CL (Tabela 10).

Pojačana aktivnost matriks metaloproteinaza kod HOBP pacijenata takođe se dovodi u vezu sa pojavom osteoporoze. MMP imaju regulatornu funkciju u remodeliranju koštanog tkiva, dok MMP9 i direktno utiče na aktivaciju osteoklasta (89).

Bolton i saradnici (41) su u grupi stabilnih HOBP pacijenata ispitivali korelaciju između nivoa MMP9 i TIMP1 sa BDM statusom i dokazali da MMP9 ima visoku prediktorsku moć za razdvajanje pacijenata sa i bez osteopenije i osteoporoze kod HOBP, pa je predloženo uvođenje MMP9 kao parametra za procenu rizika za nastanak osteoporoze među HOBP pacijentima. U pomenutoj studiji je dokazano i da koncentracije MMP9 koreliraju sa prisustvom osteoporoze nezavisno od stanja respiratorne funkcije. Značajan izvor MMP9 i TIMP1 kod HOBP su neutrofilii (92). Aktivirani neutrofilii u perifernoj cirkulaciji oslaobađaju 2,5 puta više MMP9 kod HOBP pacijenata u odnosu na zdrave (85). Matriks metaloproteinaza 9 je slaba kolagenaza, pa je malo verovatno da je odgovorna za razlaganje kolagena tipa 1, već je značajnija njena uloga u aktivaciji preosteoklasta i procesu remodeliranja koštanog tkiva (93). Ispitivanjem povezanosti visokog nivoa proteolize sa nivoom resorpcije, u našoj studiji je kod klinički stabilnih pacijenata dokazana pozitivna korelacija između TIMP1 i beta-CL. Pozitivna korelacija između procenta neutrofila i koncentracije beta-CL u našoj studiji može biti posmatrana kao veza između izvora oksidativnog stresa, inflamacije i proteolitičkog sistema i pojačane resorpcije koštanog tkiva kod HOBP pacijenata (Tabela 10). Stanje egzacerbacije kod HOBP donosi i pojačanu inflamatornu reakciju, hipoksemiju i upotrebu kortikosteroidne terapije, što skupa dovodi do rizika od smanjenja gustine koštanog tkiva (40). U našoj studiji je takođe u stanju egzacerbacije dokazana pojačana sistemska inflamacija (povišen hsCRP), oksidativni stres (povišen TOS) i hipoksemija (snižen Pa_{O_2}) sa povišenom resorpcijom koštanog tkiva (povišen beta-CL) (Tabela 9).

U daljem toku našeg istraživanja ovakav rezultat nas je naveo na ispitivanje uticaja respiratorne funkcije, oksidativnog stresa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema na nivo beta-CL koristeći multiplu regresionu analizu. Rezultati ove analize pokazali su da je povećanje resorpcije koštanog tkiva u stanju egzacerbacije posledica složene interakcije svih bitnih patogenetskih karakteristika ove hronične bolesti (Tabela 11).

5.2. Ishemijska bolest srca kod HOBP

Ranije studije ukazale su na činjenicu da HOBP može biti sama po sebi nezavisni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Naime, opadanje FEV₁, kako kod HOBP tako i u opštoj populaciji, znači veći rizik od KVB (94,95). Sin i saradnici dokazali su da pacijenti u grupi sa najnižim FEV₁ imaju najveći rizik od KVB i pet puta veću verovatnoću od smrtnosti od ishemijske bolesti srca (IBS) u poređenju sa pacijentima sa najvišim vrednostima FEV₁ (19). Rezultati ove studije pokazali su da HOBP pacijenti sa dijagnostikovanom IBS imaju izraženiju opstrukciju disajnih puteva (FEV₁ % kod IBS+ vs. IBS-: 58.2 ± 16.2 vs. 68.5 ± 19.2) (Tabela 13). Hronična inflamacija koja karakteriše HOBP još od ranije je označena kao faktor rizika za razvoj KVB i smrtnost u opštoj populaciji i među HOBP pacijentima (78,96). Tako je CRP, marker sistemske inflamacije prepoznat i kao marker povećane smrtnosti u populaciji pacijenata sa HOBP (96). Studije *in vitro* pokazale su da CRP negativno utiče na vazomotornu aktivnost endotela krvnih sudova kroz inhibiciju sintezu azot monoksida (97). Formula Framinghamske studije (*eng.* Framingham Risk Score), najčešće korišćena za procenu rizika od razvoja KVB je poboljšana dodatkom CRP u prediktivni model (98). U ovoj studiji dokazano je prisustvo viših koncentracija hsCRP u cirkulaciji pacijenata sa IBS u odnosu na one kod kojih IBS nije dijagnostikovana, ali bez statističkog značaja (Tabela 15).

Ranije je već rečeno da su pacijenti sa HOBP izloženi i konstantnom oksidativnom stresu. Aktivirani neutrofilni periferne cirkulacije kod HOBP pacijenata oslobađaju velike količine ROS, imaju povećanu ekspresiju adhezionih molekula i pokazuju pojačanu hemotoksičnu i proteolitičku aktivnost, mehanizme uključene u patogenezu ateroskleroze (99). Reaktivne kiseonične grupe, pre svega slobodni radikali kiseonika, mogu da oštete membranu ćelija i intereaguju sa endogenim vazoaktivnim medijatorima u endotelnim ćelijama krvnih sudova i na taj način utiču na vazomotoriku i aterosklerotski proces. Istovremeno ROS uzrokuje i lipidnu peroksidaciju i formiranje oksidovanih lipoproteina (LDL), jednog od ključnih medijatora u formiranju aterosklerotskih plaka. Reaktivne kiseonočne grupe učestvuju i u oštećenju krvnih sudova, kroz promenu njihove elastičnosti, promociju inflamatornog odgovora, migraciju i adheziju leukocita, povećanja migracije i proliferacije glatkih mišićnih ćelija tunike medije, što na kraju za posledicu ima nastanak plaka (100). Izražen oksidativni stres, naročito u toku egzacerbacija HOBP, zajedno sa pojačanom inflamacijom, može

dovesti do nestabilnosti plaka vodeći ka njihovoj rupturi. Usled smanjene respiratorne funkcije kod HOBP pacijenata hipoksija javlja tokom egzacerbacije, dok je u stadijumima bolesti III i IV stalno prisutna. Hipoksija ispoljava brojne uticaje na razvoj ateroskleroze. Kada su makrofage izložene hipoksiji formiraju veću količinu penastih ćelija (101). Kod animalnih modela u uslovima hipoksije došlo je do redukovanja antioksidativne moći superoksid-dismutaze u miokardu (102). U ovoj studiji dokazana je smanjena antioksidativna zaštita kod HOBP pacijenata (Tabela 3), kroz smanjenu aktivnost enzima SOD i POaze. Mackness i saradnici (103) su bili prvi koji su dokazali da prečišćeni humani PON1 ima sposobnost inhibicije oksidacije LDL čestica *in vitro*. Sposobnosti PON1 da hidrolizuje oksidovane lipide i utiče na nastanak i razvoj ateroskleroze je dokazana u studijama na genetski modifikovanim miševima (104) i ljudima koje su potvrdile da su niske aktivnosti serumske PON1 (koje se uglavnom objašnjavaju kao posledica pojačanog oksidativnog stresa i automatski sniženim kapacitetom antioksidativne zaštite) vezane sa razvojem KVB (105). Smanjena aktivnost PON1 u populaciji HOBP pacijenata dokazana je i lokalno u plućnom tkivu, čiji su izvor Clara ćelije, edotelne ćelije i i alveolarne epitelne ćelije (106), kao i sistemskoj cirkulaciji (107). Rezultati naše studije takođe ukazuju na smanjenu aktivost PON1 kod HOBP pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 3) i istovremeno nižu aktivnost u grupi HOBP pacijenata sa IBS u odnosu na pacijente bez IBS (Tabela 14). Izraženiji oksidativni stres, viši nivo CRP i neutrofila u podgrupi pacijenata sa IBS u našoj studiji ukazuje i na povećani rizik od dalje progresije bolesti (Tabela 15). Na osnovu ovih rezultata može se ukazati na potrebu da se HOBP pacijenti podvrgnu neinvazivnim dijagnostičkim metodama, kao što je merenje debljine intima-medije, u cilju otkrivanja potencijalnog razvoja KVB.

Lipidni status jedan je od konvencionalnih faktora rizika za pojavu KVB. U našoj studiji se lipidni status kod pacijenata sa IBS neznatno razlikuje od lipidnog statusa pacijenata bez IBS (Tabela 17).

HOBP karakteriše i pojačana proteolitička aktivnost i destrukcija ECM u plućima (92). Pojačana proteoliza prisutna je međutim i u vezivnom tkivu endotela krvnih sudova, dovodeći do tanjenja arterija (108). Ako se uzme u obzir da cirkulišući monociti pacijenata sa HOBP oslobađaju 2,5 puta više MMP9 u odnosu na zdrave (40,44) i da je MMP9 uključen u patogenezu ateroskleroze (33,34), kao i da je TIMP1 u korelaciji sa

najznačajnijim konvencionalnim faktorima rizika za razvoj KVB (109) ovi parametri postali potencijalni faktori rizika za razvoj KVB. Na ovakav potencijal parametara remodeliranja ekstracelularnog matriksa, pre svega MMP9 i TIMP1, potvrdila je Framingham studija koja je uključila preko 3000 ispitanika sa dijagnostikovanim KVB, kod kojih je dokazno da je koncentracija TIMP1 u korelaciji sa najznačajnijim faktorima rizika za KVB (110). Velagelati i saradnici u svojoj studiji dokazali su da povećanje koncentracije TIMP1 povećava rizik od smrti uzrokovane KVB, kao i bolju prediktivnu moć u odnosu na konvencionalne faktore rizika (40).

Rezultati naše studije ukazali su naročito izraženu razliku u koncentraciji TIMP1 između pacijenata sa i bez IBS (Tabela 16). Zatim je izvršeno ispitivanje korelacije ovog parametra sa ostalim ispitivanim markerima. U grupi pacijenata sa IBS dokazana je pozitivna korelacija TIMP1 sa Pa_{O_2} , ukazujući na pojačanu proteolitičku aktivnost sa povećanjem hipoksije. Takođe je dokazana pozitivna korelacija i sa procentom neutrofila, što je u skladu sa rezultatima predhodnih studija koje ukazuju na neutrofile kao izvor MMP i TIMP1 (111). Istovremeno nije dokazana nikakva korelacija TIMP1 sa parametrima respiratorne funkcije i lipidnog statusa (Tabela 18). Među pacijentima bez IBS dokazana je pozitivna korelacija između nivoa TIMP1 i FVC i TOS (Tabela 18).

Jedan od ciljeva studije bio je i ispitivanje prediktorske moći ispitivanih parametara za pojavu IBS među HOBP pacijentima (Tabele 19-23).

Markeri limitiranosti disajnih puteva, FEV_1 i redukovani FEV_1/FVC odnos, predstavljaju nezavisne faktore rizika za pojavu koronarnih bolesti. Engtrom i saradnici u svojoj studiji došli su do rezultata koji pokazuju da se sa opadanjem respiratornog kapaciteta proporcionalano raste rizik od pojave koronarnih bolesti među pušačima (112). Rezultati naše studije pokazali su da među parametrima respiratorne funkcije najbolju prediktorsku moć za pojavu ishemijske bolesti srca među HOBP pacijentima ima FVC (Tabela 19).

Među parametrima oksidativnostresnog statusa najbolju prediktorsku moć među našim ispitanicima pokazuje TOS (Tabela 20). Markeri inflamacije i lipidnog statusa nemaju prediktorsku moć za pojavu IBS u našoj grupi ispitanika. Kod parametara proteaza/antiproteaza sistema, kao parametar sa najvećom prediktorskom moći za razvoj IBS izdvaja se TIMP1.

Starost, pušenje i pol u opštoj populaciji utiču na zastupljenost KVB u opštoj populaciji. Da bi ispitali njihov uticaj na ispitivane parametre formirani su modeli za svaki od pomenutih faktora rizika (Model 1-3) i model koji objedinjuje sve pomenute faktore (Model 4). Na taj način došlo se do rezultata da starenje dodatno pojačava uticaj svih ispitivanih parametara na razvoj IBS, kao i udruženi efekat godina, pola i pušenja (Model 3 i 4) (Tabele 19-23). Iako je pušenje jedan od najčešće navođenih faktora rizika kako za razvoj HOBP tako i bolesti kardiovaskularnog sistema (27) interesantno je da u našoj studiji pušenje nije faktor koji utiče na prediktorsku moć parametara oksidativno stresnog statusa i inflamacije (Model 2) (Tabela 20-21).

5.2.1. TIMP1 kao potencijalno novi faktor rizika za razvoj IBS u populaciji pacijenata sa HOBP

Metabolizam ekstracelularnog matriksa igra bitnu ulogu u održavanju funkcionalnosti parenhima brojnih organa. Abnormalnosti metabolizma ECM i disbalans proteaza/antiproteaza sistema direktni su uzročnici procesa vezanih za razvoj brojnih bolesti, uključujući razgradnju zida alveola kod HOBP, tanjenje zida aterija i rupturu plaka kod ateroskleroze, nastanak i metastaze tumora. Metabolizam ECM je kontrolisan ravnotežom između razgradnje pod uticajem matriks metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora. Neke od markera ECM moguće je meriti u serumu ili plazmi, i na taj način pratiti remodeliranje ECM. Marker metabolizma ECM koji je već prepoznat kao faktor koji utiče na razvoj i prognozu KVB su MMP9 i TIMP1 (76). Povećan nivo ovih markera u cirkulaciji povezan je sa rizikom od smrti kod pacijenata sa KVB (113).

Povećane koncentracije TIMP1 u našoj grupi ispitanika sa HOBP u odnosu na zdravu populaciju (Tabela 5) u skladu je sa studijom u kojoj je dokazana prediktorska moć TIMP1 u prognozi smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti (114). Nakon podele pacijenata na podgrupe u odnosu na prisustvo IBS, dokazana je veća koncentracija ovog parametra u podgrupi pacijenata sa IBS (Tabela 15), ukazujući na pojačan metabolizam ECM među ovim ispitanicima. Takođe rezultati naše studije ukazali su na visoku prediktorsku moć TIMP1 na razvoj IBS nezavisno od godina, pola i statusa pušenja (Tabela 22). Nivo TIMP1, kao specifičnog parametra metabolizma ECM, mogao bi se uzeti u razmatranje kao potencijalni parametar za procenu rizika od IBS kod HOBP pacijenata. U cilju provere dijagnostičke

tačnosti nivoa TIMP1 u procesu razdvajanja HOBP pacijenata sa i bez IBS, urađena je analiza ROC krive. Na osnovu površine ispod ROC krive zaključili smo da TIMP1 pokazuje na osnovu Hosmer-vih i Lemeshow-ih pravila (115) „odličnu“ dijagnostičku tačnost za izdvajanje pacijenata sa IBS (AUC=0,812) (Tabela 24). Prilikom utvrđivanja dijagnostičkog značaja modela koji uključuju i druge faktore rizika, FEV₁, hsCRP, TOS (Model 1-5), može se zaključiti da najbolji dijagnostički značaj ima upravo model koji uključuje pored TIMP1 i druge faktore rizika. Na taj način dobija se čak 86,67% tačno klasifikovanih pacijenata u odnosu na 72,22 % kada je u analizu uključen samo TIMP1.

Rezultati naše studije pokazali su da povećani nivo TIMP1 prati i dijagnostikovana IBS kod HOBP pacijenata. Ovakvi rezultati ukazuju na mogućnost uvođenja TIMP1 kao potencijalno novog faktora rizika za razvoj IBS u populaciji HOBP pacijenata. Ograničenje naše studije je relativno mali broj ispitanika. Dalji tok istraživanja koja bi uključila i dodatni broj ispitanika, trebalo bi usresrediti i na ispitivanje i dodatnih markera remodeliranja ECM, kao što su proizvodi razgradnje kolagena i elastina iz zida krvnih sudova.

Generalno rezultati ovog dela studije ukazuju na mogućnost uvođenja TIMP1 kao novog markera u proceni rizika od IBS kod pacijenata sa HOBP.

6. ZAKLJUČCI

6.1. Oksidativnostresni status, inflamacija, proteaza/antiproteaza sistem i njihova korelacija sa kliničkoim stanjem pacijenata

1. Koncentracija parametara oksidativnog stresa viša je kod HOBP pacijenata u sva tri stanja u odnosu na kontrolnu grupu. Visoke koncentracije u stanju egzacerbacije nastavljaju sa rastom i tokom hospitalizacije, dok u stabilnom stanju njihov nivo opada.
2. Enzimi antioksidativne zaštite imaju nižu aktivnost u odnosu na zdrave ispitanike. Aktivnost SOD i PON1 u stanju egzacerbacije neznatno su više u odnosu na stabilno stanje. Tokom hospitalizacije aktivnost SOD opada, nasuprot tome aktivnost PON1 raste.
3. Inflamacija je najizraženija u stanju egzacerbacije. Koncentracija hsCRP opada tokom hospitalizacije ali opet blago raste do kontrolnog pregleda. Sa druge strane trend opadanja koncentracije neutrofila tokom hospitalizacije nastavlja se i nakon bolničkog lečenja.
4. Aktivnost MMP9 se smanjuje stabilizacijom bolesti, iduću od egzacerbacije ka klinički stabilnom stanju, dok TIMP1 najveću aktivnost ima u stabilnom stanju a akutizacija bolesti dovodi do smanjenja aktivnosti, što se nastavlja i u toku hospitalizacije. Koncentracija formiranog MMP9-TIMP1 kompleksa najniža je u stabilnom stanju i raste u toku hospitalizacije.
5. Procenat predviđenog FEV₁ u negativnoj je korelaciji sa koncentracijom superoksidnog anjona tokom egzacerbacije, dok u stabilnom stanju pokazuje negativnu korelaciju sa AOPP, procentom neutrofila i TIMP1.
6. Odnos FEV₁/FVC % na prijemu je u negativnoj korelaciji sa koncentracijom superoksidnog anjona i AOPP.
7. Parcijalni arterijski pritisak kiseonika pokazao je pozitivnu korelaciju sa aktivnošću SOD u stanju egzacerbacije
8. U stanju egzacerbacije postoji značajna pozitivna korelacija između koncentracije hsCRP i nivoa PAB.

9. U stanju egzacerbacije postoji pozitivna korelacija između koncentracije AOPP i koncentracije svih ispitivanih parametara proteaza/antiproteaza sistema, odnosno MMP9, TIMP1 i kompleksa MMP9-TIMP1
10. U ovom stanju je dobijena i pozitivna korelacija između TOS i MMP9, TOS i TIMP1
11. U stanju egzacerbacije koncentracija hsCRP u pozitivnoj je korelaciju sa koncentracijom TIMP1
12. Procenat neutrofila u pozitivnoj je korelaciji sa koncentracijom kompleksa MMP9-TIMP1 i u stanju egzacerbacije i u stabilnom stanju

6.2. Zaključci o promeni resorpcije koštanog tkiva u stanju egzacerbacije

1. Koncentracije beta-CL kod HOBP pacijenata statistički značajno je viša u odnosu na kontrolnu grupu u stanju egzacerbacije i stabilnom stanju.
2. Nivo beta-CL značajno raste tokom egzacerbacije u odnosu na stabilno stanje.
3. Rezultati statističke analize pokazali su da ne postoji korelacija između nivoa beta-CL ni sa jednim parametrom respiratorne funkcije kako na prijemu tako i na kontrolnom pregledu.
4. U stanju egzacerbacije dokazana je pozitivna korelacija između MDA i aktivnosti PON1i beta-CL
5. Kod pacijenata u stabilnom stanju kao ni u kontrolnoj grupi nije dokazana nikakva korelacija između nivoa beta-CL i parametara oksidativnog statusa.
6. Pozitivna korelacija između nivoa beta-CL i hsCRP postoji u stabilnom stanju, dok je u stanju egzacerbacije ovakva korelacija dokazana u odnosu na procenat neutrofila u perifernoj cirkulaciji.
7. U stanju egzacerbacije ne postoji korelacija između nivoa beta-CL ni sa jednim parametrom proteaza/antiproteaza sistema.
8. U stabilnom stanju postoji pozitivna korelacija beta-CL sa TIMP1.

9. Ispitivanjem u kontrolnoj grupi nije dokazana korelacija beta CL ni sa jednim parametrom proteaza/antiproteaza sistema.

10. Multipla regresiona analiza je pokazala da je skoro 60% varijabilnosti u kocentraciji beta-CL posledica interakcije respiratorne disfunkcije odnosno hipoksije (sniženi Pa_{O_2}), inflamacije (povećan % neutrofila), oksidativnostresnog statusa (povišeni TOS i snižena aktivnost PON1) i proteaza/antiproteaza sistema (povišene koncentracije TIMP1).

6.3. Zaključci o uticaju prisustva IBS na parametre oksidativnostresnog statusa, inflamacije i proteaza/antiproteaza sistema

1. Pacijenti sa IBS imaju pojačan oksidativni stres i smanjenu antioksidativnu zaštitu u odnosu na pacijente bez IBS.

2. Inflamacija kod HOBP pacijenata sa IBS intenzivnija je u odnosu na pacijente bez IBS.

3. Dokazno je da grupa pacijenata sa IBS ima statistički značajno više vrednosti koncentracije TIMP1 u odnosu na pacijente bez IBS. Razlika u koncentracijama MMP9 i kompleksa MMP9-TIMP1 nije statistički značajna.

4. Ispitivanjem korelacije između parametara respiratorne funkcije i TIMP1, u podgrupi HOBP pacijenata sa IBS dokazana je negativna korelacija sa Pa_{O_2} .

5. Analizom korelacija parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite sa nivoom TIMP1 kod pacijenata sa IBS dokazana je pozitivna korelacija sa TOS.

6. Kod HOBP pacijenata sa IBS postoji pozitivna korelacija između TIMP1 i procenta neutrofila.

7. Nema značajne korelacije između TIMP1 i parametara lipidnog statusa kod IBS pozitivnih pacijenata.

8. Logističkom regresionom analizom parametara respiratorne funkcije dokazano je da najbolju prediktorsku moć na razvoj IBS ima smanjenje % FVC.

9. Među parametrima oksidativnostresnog statusa najveća prediktorska moć dokazana je za TOS.

10. Logističkom regresionom analizom pokazano je i da hsCRP ima bolju prediktorsku moć za razvoj IBS od % neutrofila, ali ipak bez statističkog značaja.
11. Logistička regresiona analiza uticaja parametara proteaza/antiproteaza sistema za razvoj IBS pokazala je da visoku prediktivnu moć ima TIMP1.
12. Prediktorska moć TIMP1 ostaje značajna i nakon modifikacije za faktore rizika (FEV₁, hsCRP i TOS) pojedinačno i udruženo.
13. Dijagnostička tačnost TIMP1 u procesu razdvajanja osoba sa i bez rizika od IBS je na osnovu Hosmer-vih i Lemeshow-ih pravila ocenjena kao odlična (AUC=0,812).

6.4. Opšti zaključci

1. Pacijenti sa HOBP su hronično u stanju pojačanog oksidativnog stresa, inflamacije i disbalansa proteaza/antiproteaza sistema, sa izrazitim pogoršanjem u toku egzacerbacije.
2. Pojačana resorpcija koštanog tkiva prisutna je i u stabilnom stanju sa izrazitim pojačanjem tokom akutizacije bolesti.
3. Promena u nivou resorpcije koštanog tkiva posledica je udruženog efekta pojačane inflamacije, oksidativnog stresa i proteolize.
4. Prisustvo IBS kod HOBP pacijenata praćeno je pojačanim oksidativnim stresom i inflamacijom, kao i izraženijim proteaza/antiproteaza disbalansom.
5. TIMP1 može biti potencijalno novi marker za procenu rizika za razvoj IBS u populaciji pacijenata sa HOBP.

7. LITERATURA:

1. Agusti A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:522-525.
2. Republika Srbija, Ministarstvo zdravlja, Istraživanje zdravlja stanovnika Republike Srbije, 2006. Godina - finalni izveštaj, maj 2007. godine.
3. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:S77–S121.
4. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J (September 2007). „Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary“. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2007;176 (6): 532–555.
5. Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000;117:398S–401S.
6. MacNee W, Tudrer RM. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:527-531.
7. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 2007;28:479-513.
8. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*. 2006;61:448–454.
9. McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001;47:619–635.
10. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med* 2003;97:1299–1302.

11. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21:347–360.
12. Olivera DS, Boggs SE, Beenhouwer C, Aden J, Knall C. Cellular mechanisms of mainstream cigarette smoke-induced lung epithelial tight junction permeability changes in vitro. *Inhalation Toxicology*. 2007;19:13-22.
13. Singh D, Edwards L, Tal-Singer R, Rennard S. Sputum neutrophils as a biomarker in COPD: findings from the ECLIPSE study. *Respir Res*. 2010;11:77.
14. Michel O, Dentener M, Corazza F, Buurman W, Rylander R. Healthy subjects express differences in clinical responses to inhaled lipopolysaccharide that are related with inflammation and with atopy. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(5):797–804.
15. Sabit R, Thomas P, Shale DJ, Collins P, Linnane SJ. The effects of hypoxia on markers of coagulation and systemic inflammation in patients with COPD. *Chest*. 2010;138(1):47–51.
16. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor- α system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1179–1184.
17. Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001;56(6):432–437.
18. Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agusti AG. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1664–1668.
19. Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996;51:819–824.

20. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Vestbo J, Lange P, Nordestgaard BG. Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1008–1011.
21. Watson L, Vonk JM, Lofdahl CG, et al. Predictors of lung function and its decline in mild to moderate COPD in association with gender: results from the Euroscop study. *Respir Med*. 2006;100:746–753.
22. Dentener MA, Vreugdenhil AC, Hoet PH, Vernooij JH, Nieman FH, Heumann D, Janssen YM, Buurman WA, Wouters EF. Production of the acute-phase protein lipopolysaccharide-binding protein by respiratory type II epithelial cells: implications for local defense to bacterial endotoxins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:146–153.
23. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:222-239.
24. Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 1984; 105:429-435.
25. Boveris A. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977;78:67-82.
26. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-22.
27. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*. 1996;21:669–681.
28. Tsukagoski H, Shimizu Y, Iwamae S, et al. Evidence of oxidative stress in asthma and COPD: potential inhibitory effect of theophylline. *Respir Med* 2000;94:584-588.
29. Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, et al. Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000:166:101-110.

30. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2004;56:515–548.
31. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:246–255.
32. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:38–43.
33. Campbell E J, Campbell M A, Boukedes S S, Owen C. Quantum proteolysis by neutrophils: implications for pulmonary emphysema in α 1-antitrypsin deficiency. *J Clin Invest* 1999;104: 337–344.
34. Churg A, Wright J L. Proteases and emphysema. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11:152–159.
35. Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:361–367.
36. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease–antiprotease imbalance, and inflammation. *International Journal of COPD* 2011;6:413–421.
37. Owen CA, Hu Z, Barrick B, Shapiro SD. Inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:283–294.
38. Pons AR, Sauleda J, Noguera A, et al. Decreased macrophage release of TGF- β and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005;26:60–66.
39. Biskobing DM. COPD and osteoporosis. *Chest* 2002;121:609-620.
40. Kiyokawa H, Muro S, Oguma T, Sato S, Tanabe N, Takahashi T, et al. Impact of COPD exacerbation on osteoporosis assessed by chest CT scan. *COPD* 2012;9:235-242.
41. Bolton CE, Stone MD, Edwards PH, Ducker JM, Evans WD, Shale DJ. Circulating MMP-9 and osteoporosis in patients with COPD. *Chron Respir Dis* 2009;6:81-87.

42. Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti AG. Mortality in COPD: role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006;28:1245-1257.
43. Clayton TC, Thompson M, Meade TE. Recent respiratory infection and risk of CVD: case control study through a general practice data base. *Eur Heart J* 2008;29:96-103.
44. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
45. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail.* 2008;10:933-989.
46. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardization of spirometryATS/ERS task force: standardization of lung function testing. *Europ Respir J* 2005;26:319-338.
47. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation product in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991;31:32-35.
48. Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, et al Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2007;40:181-187.
49. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-1313.
50. Erel O. A new automated method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-1111.

51. Alamdari DH, Morbarhan MG, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebbati M, Ghafoori F, et al. Pro-oxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008;41:375-380.
52. Misra HP, Fridovich I. Chemistry and metabolism of substances of low molecular weight: the role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.
53. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1192 or PON155 genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2441-2447.
54. Bland JM, Altman DG. Statistics notes: transformations, means and confidence intervals. *BMJ* 1996;312:1079-1080.
55. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, et al. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000;55:114-120.
56. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33-50.
57. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 2000;117:303S-317S.
58. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003;22:14-27.
59. MacNee W. Oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir monograph* 2006; 11:100-129.
60. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:50-60.
61. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1055-1060.

62. Hageman GJ, Larik I, Pennings HJ, Haenen GR, Wouters EF, Bast A. systemic poli(ADP-ribose) polimerase-1 activation, chronic inflammation, and oxidative stress in COPD patients. *Free Radic Biol Med* 2003;35:140-148.
63. Parizadeh MR, Azarpazhooh MR, Mobarra N, Nematy M, Alamdari DH, Tavalalaie S, et al. Prooxidant-antioxidant balance in stroce patients and 6-month prognosis. *Clin Lab* 2011;57:183-191.
64. Alamdari DH, Mobarhan MG, Tavallaie S, Parizadeh MR, Moohebbati M, Ghafoori F, et al. Pro-oxidant-antioxidant balance as a new risk factor in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2008;41:375–380.
65. Boskabadi H, Boroujeni AN, Mostafavi-Toroghi H, Hosseini G, Ghayour-Mobarhan M, Alamdari DH, et al. PAB in perinatal asphyxia. *Indian J Pediatr* 2014;81(3):248-253.
66. Stanojkovic I, Kotur-Stevuljevic J, Milenkovic B, Spasic S, Vujic T, Stefanovic A, Ilic A, Ivanisevic J. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation. *Respiratory Medicine* 2011;105:S31-37.
67. Scharberger T, Haller H, Rau M, Kaiser D, Fassbender M, Lode H. Superoxide anion releas induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers. *Eur Respir J* 1992;5:387-393.
68. Hoidal JR, Fox RB, LeMarbe PA, Perri R, Repine JE. Altered oxidative metabolic responses in vitro of alveolar macrophages from asymptomatic cigarette smokers. *Am Rev Resp Dis* 1981;123:85-89.
69. MacNee W. Oxidative stres and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001;429:195-207.
70. Heunks LM, Vina J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, Dekhuijzen PN. Xanthine oxidase is involved in exersise-induced oxidative stress in chronic oxidative stress disease. *Am J Physiol* 1999;277:R1697-R1704.

71. Frangulyan R, Anderson D, Drost E, Hill A, MacNee W. Exhaled markers of inflammation in breath condensate in patients with bronchiectasis and COPD. *Thorax* 2003;58:S116.
72. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, FitzGerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with increase in urinary levels of isoprostane F₂alpha-III, an index of oxidative stress. *Am J Respir Care Med* 1998;158:1709-1714.
73. Scholz H, Yndestad A, Damas JK, Waehre T, Tonstad S, Aukrust P, Halvorsen B. 8-isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res* 2003;59:945-954.
74. Arsalane K, Dubois CM, Muanya T, Begin R, Boudreau F, Asselin C, Cantin AM. Transforming growth factor-beta 1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in the lung epithelial cell line A549; transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:599-607.
75. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor-kappa B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002;20:556-563.
76. Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Duffin R, et al. Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;166:101-110.
77. Wouters E.F.M. local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:26-33.
78. Sin DD, Man SFP. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular disease? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003;107:1514-1519.
79. Man SF, Connett JE, Anthonisen NR, Wise RA, Tashkin DP, Sin DD. C-reactive protein and mortality in mild to moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2006;61:849-853.

80. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175: 250-255.
81. Yamamoto C, Yoneda T, Yashikava M, et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 1997;112:505-510.
82. Chan-Yeung M, Abboud R, Buncio AD, Vedal S. Peripheral leukocyte count and longitudinal decline on lung function. *Thorax* 1988;43:462-466.
83. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645–2653.
84. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax* 2007;62:595–601.
85. Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, Janciauskiene S. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respir Res* 2003;4:11.
86. Engelen MPKJ, Schols AMWJ, Heidendal GAK et al. DEXA in the clinical evaluation of body composition and bone mineral density in patients with COPD. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1298-1303.
87. Aris R, Neuringer I, Weiner M et al. Severe osteoporosis before and after lung transplantation. *Chest* 1996; 109:1176-1183.
88. Bolton CE, Ionescu AA, Shiels KM. Associated loss of fat free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(12):1286-1293.
89. Anderson TL, del Caram Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaissé JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone* 2004;35:1107–1119.

90. Kochetkova EA, Geltser BI, Semisotova EF, Volkova MV. Biochemical and immunological markers of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Klin Med* 2002;80:31-35.
91. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev.* 2007;65(12 Pt 2):S147–151.
92. Cataldo D, Munaut C, Noel A, et al. Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics. *Allergy* 2001;56:145–151.
93. Engsing MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, i saradnici. MMP9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into development long bones. *J Cell Biol* 2000;151:879-889.
94. Sin DD, Wu L, Man SF. The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality: a population-based study and a systematic review of the literature. *Chest* 2005;127:1952–1959.
95. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;347:1557-1565.
96. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006;60:17-22.
97. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2003;107:398-404.
98. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham coronary heart disease risk score. *Circulation* 2003;108:161-165.
99. MacNee W, Maclay J, McAllister D. Cardiovascular injury and repair in COPD. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:824-833.

100. Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanism of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:48-54.
101. Lathimor JD, Wilcox I, Nakhla S, Langenfeld M, Jessup W, Celermajer DS. Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages—a potentially atherogenic effect. *Atherosclerosis* 2005;179:255-259.
102. Chan L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, Scharf SM. Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:915-920.
103. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286(1-2):152-154.
104. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, et al. Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphism and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA* 2008;299:1265-1276.
105. Rozek LS, Hatsukami TS, Richter RJ, Ranchalis J, Nakayama K, McKinstry LA, et al. The correlation of paraoxonase (PON1) activity with lipid and lipoprotein levels differs with vascular disease status. *J Lipid Res* 2005;46:1888-1895.
106. MacNee W. Antioxidants. In: Hansel TT, Barnes PJ, editors. *New drugs for asthma, allergy and COPD*. Basel, Switzerland: Karger; 2001. p. 151–155.
107. Işık B, Işık R, Yolaçan H, Işık M. Serum malonyldialdehyde and paraoxonase levels in chronic obstructive pulmonary disease. *Turk Respir J* 2005;6(1):19–21.
108. Yasmin SW, McEniery CM, O’Shaughnessy KM, Harnet P, Arshad A, Wallace S, et al. Variation in human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1799-1805.
109. Velagaleti RS, Gona P, Sundstrom J, Larson MG, Siwik D, Colluci WS, et al. Relation of extracellular matrix remodeling to incident of cardiovascular events and mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2283-2288.

110. Sundstroma J, Evansa JC, Benjamina EJ, Levya D, Larsona MG, Sawyerc DB, et al. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *European Heart Journal* 2004; 25:1509–1516.
111. Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, et al. Increased serum concentration of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J* 2005;25;885-890.
112. Engtrom G, Hedblad B, Janzon L, Valind S. Respiratory decline in smokers and ex-smokers-an independent risk factor for cardiovascular disease and death. *J Cardiovasc Risk* 2000;7:267-272.
113. Hansson J, Vasana RS, Arnlov J, Ingelsson E, Lind L, Larson A, Michaelsson K, Sundstrom J (2011). Biomarkers of extracellular matrix metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and risk of stroke, myocardial infarction, and cause-specific mortality: cohort study. *PLoS One* 6: e16185.
114. Cavusoglu E, Ruwende C, Chopra V, Yanamadala S, Eng C, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction. *Am Heart J* 2006;151:1101–1108.
115. Hosmer DW, Lemeshow S. Assessing the fit of the model. *Applied logistic regression*. NY: John Wiley and sons; 2000. p.160-164.

BIOGRAFIJA

Ivana Stanojković rođena je 21.09.1978. godine u Surdulici. Diplomirala je 1997. godine na Farmaceutskom fakultetu, smer Medicinska biohemija, Univerziteta u Beogradu.

Pripravnički staž obavila je radeći kao stručni saradnik u nastavi na Katedri za Medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Radni staž provela radeći u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Aqualab kao rukovodilac biohemijske laboratorije i kao nastavnik farmaceutske grupe predmeta u Srednjoj medicinskoj školi Zvezdara. Trenutno zaposlena u Poliklinici Allabo kao medicinski biohemičar.

Doktorske akademske studije upisala 2008. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Станојковић

број индекса 45/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Показатељи оксидативног стреса и инфламације код пацијената са хроничном опструктивном болешћу плућа и коморбидитетом“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Ивана Станојковић

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора ___Ивана Станојковић_____

Број индекса ___45/08_____

Студијски програм ___Докторске академске студије из медицинске биохемије_____

Наслов рада _“ Показатељи оксидативног стреса и инфламације код пацијената са хроничном опструктивном болешћу плућа и коморбидитетом ” _____

Ментор __ Др. Славица Спасић, редовни професор у пензији, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет_____

Потписани/а ___Ивана Станојковић_____

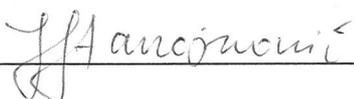
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

”Показатељи оксидативног стреса и инфламације код пацијената са хроничном опструктивном болешћу плућа и коморбидитетом“

која је моје ауторско дело.

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

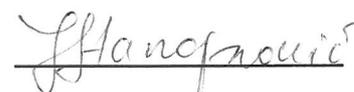
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____



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

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

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

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

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

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