

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Živka D. Malić

**FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK I  
RAZVOJ HRONIČNE OPSTRUKTIVNE  
BOLESTI PLUĆA POVEZANI SA  
OKSIDATIVNIM STRESOM U  
POPULACIJI SRBIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY

Živka D. Malić

**RISK FACTORS FOR THE  
OCCURRENCE AND DEVELOPMENT OF  
CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY  
DISEASE ASSOCIATED WITH  
OXIDATIVE STRESS IN SERBIAN  
POPULATION**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

**KOMISIJA ZA ODBRANU I OCENU DOKTORSKE DISERTACIJE**

---

**Prof. Dr Aleksandra Topić, redovni profesor (mentor)**

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

**Dr Đorđe Francuski, viši naučni saradnik (mentor)**

Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

---

**Prof. Dr Zorica Lazić, redovni profesor**

Univerzitet u Kragujevcu - Fakultet medicinskih nauka

---

**Dr Dragica Radojković, naučni savetnik**

Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, i jednim delom na katedri za Farmaceutsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, i u Laboratoriji Doma zdravlja “Dr Milenko Marin”, u Loznici, pod rukovodstvom Prof. Dr Aleksandre Topić i Dr Đorđa Francuskog.*

*Najviše se zahvaljujem mentoru Prof. Dr Aleksandri Topić na ukazanom poverenju, savetima, posvećenom vremenu, strpljenju i nesebičnoj podršci koju mi je pružila u toku svih faza izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Bila mi je čast raditi sa Vama.*

*Iskreno se zahvaljujem mentoru Dr Đorđu Francuskom na savetima, podršci, vođenju kroz ekperimentalni rad, posvećenom vremenu i velikom strpljenju tokom zajedničkog rada.*

*Dr Dragici Radojković želim da se zahvalim na ukazanom poverenju i korisnim savetima tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Prof. Dr Zorici Lazić zahvaljujem na velikoj pomoći pri realizaciji eksperimentalnog dela rada.*

*Prof. Dr Bojanu Markoviću želim da se zahvalim na korisnim savetima i pomoći tokom eksperimentalnog dela rada.*

*Svim članovima Laboratorije 03, Instituta za molekularnu genetiku, se zahvaljujem na savetima i pomoći tokom eksperimentalnog rada, a posebno na divnoj atmosferi i osećaju pripadanja.*

*Takođe se zahvaljujem kolegicama iz Doma zdravlja Dr Milenko Marin”, na podršci i divnoj atmosferi tokom zajedničke saradnje.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, koja je bila, i ostala moja snaga i najveća podrška da istrajem na svom putu bez obzira na teške trenutke kojih je bilo prilikom izrade disertacije.*

# **FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK I RAZVOJ HRONIČNE OPSTRUKTIVNE BOLESTI PLUĆA POVEZANI SA OKSIDATIVNIM STRESOM U POPULACIJI SRBIJE**

## **REZIME**

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je sporo progresivno oboljenje koje se karakteriše ograničenim protokom vazduha kroz disajne puteve, koje nije potpuno reverzibilno. Ovo ograničenje je obično udruženo sa oksidativnim stresom i hroničnim inflamatornim odgovorom pluća na različite štetne nokse, među kojima duvanski dim ima najznačajniju ulogu. Merenje biomarkera oksidativnog stresa, 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oxodG) u urinu, kao produkta oksidativnog oštećenja DNK, značajno je za procenu sistemskih efekata oksidativnog stresa. Za procenu red-ox statusa organizma koriste se dva pristupa: prvi obuhvata merenje ukupnog oksidativnog statusa (TOS) i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC), dok drugi podrazumeva izračunavanje oksidativnog indeksa (OSI). Step en izloženosti duvanskom dimu procenjuje se kvalitativno (na osnovu podataka o pušačkom statusu), kvantitativno određivanjem komponenti duvanskog dima ili njegovih metabolita (određivanjem urinarnog kotinina) i određivanjem kumulativnog dejstva duvanskog dima (izračunavanje indeksa paklo/godine). Razlike u preosetljivosti za nastanak HOBP-a, uslovljene su genskim varijantama enzima uključenih u detoksikaciju produkata duvanskog dima. U prvoj fazi metabolizma, pod dejstvom CYP P-450 enzima, štetne supstance se prevode u reaktivne intermedijere, dok se u drugoj fazi, pod dejstvom mikrozomalne hidrolaze epoksida (mEPHX) i glutation-S-transferaze (GSTs), vrši njihova detoksikacija. Cilj ove studije bio je ispitivanje genetskih i ne-genetskih faktora rizika, povezanih sa povišenim oksidativnim stresom, kao i njihovih interakcija, u nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) u populaciji Srbije. Takođe, cilj je bio da se ispita i potencijalni značaj biomarkera koji su povezani sa oksidativnim stresom u dijagnostici i predikciji težine HOBP-a.

U istraživanju je učestvovalo 195 pacijenata obolelih od hronične opstruktivne bolesti pluća (89 žena i 106 muškaraca) i 326 zdravih ispitanika koji su činili kontrolnu grupu (134 žene i 192 muškarca). Istraživanje je sprovedeno u skladu sa etičkim

principima Helsinške deklaracije i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na osnovu prethodne saglasnosti svih medicinskih ustanova koje su učestvovala u studiji. Koncentracije osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara su određene rutinskim metodama, u serumu. Spirometrijskom metodom određeni su parametri plućne funkcije, FEV1 i FVC. Serumski TOS i TAC su određeni kolorimetrijskim metodama, na automatskom analizatoru, dok je 8-oxodG određen u urinu primenom HPLC-MS/MS metode i izražen u odnosu na kreatinin u urinu (8-oxodG/kreatinin). Koncentracije kotinina u urinu određene su primenom HPLC metode, dok je kumulativno dejstvo duvanskog dima (indeks paklo/godine) izračunato na osnovu podataka prikupljenih od ispitanika. Detekcija CYP1A \*1A/2A\*, GSTP1 Ile105Val, mEPH Tyr113His, mEPH His139Arg genskih varijanti vršena je primenom PCR-RFLP metode, dok je detekcija GSTT1 \*nulti i GSTM1 \*nulti genskih varijanti vršena pomoću multipleks PCR metode.

Rezultati studije pokazuju da su koncentracije TOS, OSI i 8-oxodG/kreatinina značajno više kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (za TOS:  $0,11 \pm 0,07$  vs.  $0,03 \pm 0,01$ ; za OSI:  $0,04 \pm 0,03$  vs.  $0,01 \pm 0,01$ ; za 8-oxodG/kreatinin:  $2,97 \pm 2,03$  vs.  $1,21 \pm 0,60$ ;  $p < 0,05$ ). Značajno viši nivo 8-oxodG/kreatinina je utvrđen kod pacijenata sa teškim oblikom HOBP koji su pri tome i teški pušači, u odnosu na one sa umerenom teškom bolešću i istom težinom pušenja ( $4,91 \pm 0,68$  vs.  $2,44 \pm 0,55$ ;  $p = 0,019$ ). Kod HOBP-pacijenata utvrđene su negativne korelacije između markera oksidativnog stresa (TOS i OSI) i parametara plućne funkcije (FEV1, FVC) ( $p < 0,05$ ), kao i pozitivne korelacije između markera antioksidativne zaštite (TAC) i parametara plućne funkcije (FEV1/FVC) ( $p < 0,05$ ). Rezultati su pokazali da TOS i OSI imaju izvanrednu (TOS: AUC=0,914; OSI: AUC=0,925), a 8-oxodG/kreatinin odličnu (AUC=0,855) dijagnostičku tačnost. Prisustvo GSTM1 \*nulte genske varijante predstavlja rizik za nastanak HOBP u populaciji pušača (OR, 95% CI: 2,27, 1,00-5,19;  $p < 0,05$ ). Najveće smanjenje plućne funkcije kod HOBP-pacijenata povezano je sa udruženim uticajem povišenog oksidativnog stresa (8-oxodG/kreatinin  $> 3,5$  nmol/mmol), teškim pušenjem (paklo/godine  $> 30$ ) i prisustvom mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću (eta kvadrat=0,281;  $p < 0,001$ ). Visok nivo oksidativnog stresa (8-oxodG/kreatinin) i prisustvo GSTP1 105Val alela ili genske varijante sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću ili složenog genotipa GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska enzimska aktivnost povezano je sa nastankom HOBP, posebno u grupi nepušača. Povišen

oksidativni stres (procenjen kao OSI ili 8-oxodG/kreatinin), starenje, inflamacija (povišeni leukociti), kumulativno dejstvo duvanskog dima (paklo/godine), snižen indeks telesne mase (BMI) i prisustvo najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu predstavljaju nezavisne prediktore za nastanak HOBP. Analizom prema polu, starenje ostaje nezavisan prediktor kod muškaraca (OR, 95% CI: 1,29, 1,12-1,48;  $p < 0,001$ ), dok je kod žena pojava HOBP povezana sa povišenim intenzitetom pušenja (OR, 95% CI: 1,09, 1,01-1,16;  $p = 0,02$ ) i prisustvom najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu (OR, 95% CI: 23,67, 2,62-213,46;  $p < 0,001$ ).

Rezultati studije su pokazali da povišen oksidativni stres, inflamacija, starenje, kumulativno dejstvo duvanskog dima, snižen BMI i prisustvo najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu predstavljaju nezavisne prediktore za nastanak HOBP u populaciji Srbije. Kod oba pola, povišen oksidativni stres, inflamacija i smanjenje BMI predstavljaju nezavisne prediktore za nastanak HOBP, dok je kod muškaraca rizik povezan sa starenjem, a kod žena sa pušenjem i prisustvom najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu. Pored toga, prisustvo GSTP1 105Val alela ili mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću ili složenog genotipa GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska enzimaska aktivnost utiču na povećanje oksidativnog stresa. Povišen oksidativni stres i prisustvo mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću kod pacijenata-teških pušača, povezani su sa razvojem veoma teškog oblika HOBP. Rezultati studije su pokazali značaj primene biomarkera TOS, OSI i 8-oxodG/kreatinina u dijagnostici i prognostici HOBP. Rano otkrivanje i identifikacija faktora rizika ima potencijalno veliki značaj u prevenciji nastanka HOBP. Rezultati ove studije mogu biti značajni i u prevenciji težeg oblika HOBP, koja bi se sprovodila ranim skriningom genetskih faktora rizika, preveniranjem izloženosti pro-oksidansima i preventivnom antioksidativnom terapijom.

**Ključne reči:** hronična opstruktivna bolest pluća, ukupni oksidativni status, 8-oxodG, kreatinin, CYP P-450, mEPHX, GSTT1, GSTM1, GSTP1.

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:** 615:577.1:616.24-056(043.3)

# **RISK FACTORS FOR THE OCCURRENCE AND DEVELOPMENT OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS IN SERBIAN POPULATION**

## **ABSTRACT**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a slow progressive disease characterized by limited airflow through the airway, which is not completely reversible. This limitation is usually associated with oxidative stress and chronic inflammatory response to various harmful agents, among which tobacco smoke plays the most important role. Measurement of biomarker of oxidative stress, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in urine, as a product of oxidative DNA damage, is important for assessing the systemic effects of oxidative stress. Two approaches are used to evaluate the red-ox status of the organism: the first involves the measurement of total oxidative status (TOS) and total antioxidative capacity (TAC), while the second involves the calculation of the oxidative index (OSI). The degree of exposure to tobacco smoke is assessed qualitatively (based on smoking status data), quantitatively by determining tobacco smoke components or its metabolites (by determining urinary cotinine) and determining the cumulative effect of tobacco smoke (calculating the pack/years index). Differences in hypersensitivity to the occurrence of COPD are conditioned by gene variants of enzymes involved in detoxification of tobacco smoke products. In the first phase of metabolism, under the action of CYP P-450 enzymes, the harmful substances are translated into reactive intermediates, while in the second phase, under the action of microsomal hydrolases of epoxide (mEPH) and glutathin-S-transferase (GSTs), their detoxification is carried out. The aim of this study was to investigate genetic and non-genetic risk factors associated with elevated oxidative stress, as well as their interactions, in the occurrence and development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Serbian population. Also, the aim was to examine the potential significance of biomarkers associated with oxidative stress in the diagnosis and prediction of COPD severity.

The investigation included 195 patients with chronic obstructive pulmonary disease (89 womens and 106 mens) and 326 healthy subjects who consisted of a control group (134 womens and 192 mens). The research was conducted in accordance with the ethical principles of of the Helsinki declaration and in accordance with the regulation of



the Ethics committee for biomedical research at the Faculty of Pharmacy in Belgrade, based on the prior consent of all medical institutions that participated in the study. Concentrations of basic biochemical and haematological parameters were determined by routine methods, in serum. The lung function parameters, FEV1 and FVC, were determined by the spirometric method. Serums TOS and TAC, were determined colorimetrically on the automatic analyzer, while the 8-oxodG was determined in urine using HPLC-MS/MS method, and expressed relative to urinary creatinine (8-oxodG/creatinine). The concentrations of cotinine in urine were determined using HPLC method, while the cumulative effect of tobacco smoke (index pack/years) was calculated on the basis of data collected from the respondents. Detection of CYP1A \*1A/\*2A, GSTP1 Ile105Val, mEPH Tyr113His, mEPH His139Arg139 gene variants was performed using the PCR-RFLP method, while the detection of GSTT1 \*null and GSTM1 \*null gene variants was performed using multiplex PCR method.

The results of the study show that the concentrations of TOS, OSI and 8-oxodG/creatinine, were significantly higher in COPD-patients compared to the control group (for TOS:  $0.11 \pm 0.07$  vs.  $0.03 \pm 0.01$ ; for OSI:  $0.04 \pm 0.03$  vs.  $0.01 \pm 0.01$ ; for 8-oxodG/creatinine:  $2.97 \pm 2.03$  vs.  $1.21 \pm 0.60$ ;  $p < 0.05$ ). Significantly higher level of 8-oxodG/creatinine was established in patients with severe COPD, who were also heavy smokers, compared to those with moderate severe disease and the same smoking severity ( $4.91 \pm 0.68$  vs.  $2.44 \pm 0.55$ ;  $p = 0.019$ ). In COPD-patients negative correlations were found between oxidative stress biomarkers (TOS and OSI) and lung function parameters (FEV1, FVC) ( $p < 0.05$ ), as well as positive correlations between antioxidant protection marker (TAC) and lung function parameters (FEV1, FVC) ( $p < 0.05$ ). The results showed that TOS and OSI have extraordinary (TOS: AUC=0.914; OSI: AUC=0.925), and 8-oxodG/creatinine excellent (AUC=0.855) diagnostic accuracy. The presence of GSTM1 \*null gene variant is a risk for occurrence of COPD, in the population of smokers (OR, 95% CI: 2.27, 1.00-5.19;  $p < 0.05$ ). The highest reduction in pulmonary function on COPD-patients was associated with a combined effect of elevated oxidative stress (8-oxodG/creatinine  $> 3.5$  nmol/mmol), heavy smoking (pack/year  $> 30$ ), and the presence of mEPH phenotypes with low enzymatic activity (eta square=0.281;  $p < 0.001$ ). High level of oxidative stress (8-oxodG/creatinine) and the presence of GSTP1 105Val allele or gene variant with low mEPH enzyme activity or complex genotype GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH low enzyme activity is associated with the occurrence of COPD, especially in the group of non-smokers.

Increased oxidative stress (estimated as OSI or 8-oxodG/creatinine), aging, inflammation (elevated leukocytes), cumulative tobacco smoke (pack/years), reduced body mass index (BMI) and the presence of at least one deletion (GSTM1 \*null or GSTT1 \*null) in the complex GSTM1/GSTT1 genotype represent independent predictors for occurrence of COPD. By gender analyses, aging remains an independent predictor in men (OR, 95% CI: 1.29, 1.12-1.48;  $p < 0.001$ ), while in women, the occurrence of COPD is associated with elevated smoking intensity (OR, 95% CI: 1.09, 1.01-1.16;  $p = 0.02$ ) and the presence of at least one deletion (GSTM1 \*null or GSTT1 \*null) in the complex GSTM1/GSTT1 genotype (OR, 95% CI: 23.67, 2.62-213.46;  $p < 0.001$ ).

The results of the study showed that elevated oxidative stress, inflammation, aging, cumulative tobacco smoke, reduced BMI and the presence of at least one deletion (GSTM1 \*null or GSTT1 \*null) in the complex GSTM1/GSTT1 genotype represent independent predictors for occurrence of COPD. In both genders, increased oxidative stress, inflammation and BMI reduction are independent predictors of COPD, while in men the risk is associated with aging, and in women with smoking and the presence of at least one deletion (GSTM1 \*null or GSTT1 \*null) in the complex GSTM1/GSTT1 genotype. In addition, the presence of GSTP1 105Val allele or mEPH phenotype with low enzymatic activity or a complex genotype GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH low enzymatic activity affects the increase in oxidative stress. Increased oxidative stress and the presence of mEPH phenotypes with low enzymatic activity in patients-heavy smokers are associated with the development of a very severe COPD. The results of the study showed the importance of the use of TOS, OSI and 8-oxodG/creatinine biomarkers in the diagnosis and prognosis of COPD. Early detection and identification of risk factors is potentially important in the prevention of COPD. Obtained results of this study may be important in the prevention of a more severe form of COPD, which would be carried out by early screening of genetic risk factors, the prevention of exposure to pro-oxidants and preventive antioxidant therapy.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease, Total Oxidant Status, 8-oxodG, cotinine, CYP P-450, mEPHX, GSTT1, GSTM1, GSTP1.

**Scientific field:** Pharmacy

**Narrow scientific field:** Medical biochemistry

**UDK number:** 615:577.1:616.24-056(043.3)

## LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

ABTS - 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolidin)-6-sulfonska kiselina

ALB - albumin

ANOVA - analiza varijanse

APS - amonijum-persulfat

AUC - površina ispod krive (area under curve)

BMI - indeks telesne mase

C-C - jednostruka ugljovodonična veza

CD8<sup>+</sup> - klaster diferencijacije 8

CI - interval pouzdanosti (confidence interval)

CTAB - cetil-trimetil-amonijum-bromid

CYP P-450 - citohrom P-450 zavisne monooksigenaze (Cytochrome P-450)

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP - dezoksiribonukleotidtrifosfat

EDTA - etilendiaminotetrasirćetna kiselina

FEV1 - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi

FEV1/FVC indeks - Tiffeneau-Pinelli indeks

FVC - forsirani vitalni kapacitet

GOLD - Globalna inicijativa za hroničnu opstruktivnu bolest pluća

GSTs - glutation-S-transferaze

HDAC2 - histon deacetilaza

HESI - elektrosprej jonski izvor za zagrevanje

HOBP - hronična opstruktivna bolest pluća

HPLC-MS/MS - kombinovana tehnika visoko osetljive tečne hromatografije pod visokim pritiskom i masene spektrometrije

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - vodonik-peroksid

IL8 - interleukin 8

K-S test - Kolmogorov-Smirnov test

LOD - limit detekcije

LSD - najmanja značajna razlika (least significant difference)

LTB<sub>4</sub> - leukotrijen B<sub>4</sub>

mEPH - mikrozomalne hidrolaze epoksida  
MPO - mijeloperoksidaza  
NADPH - redukovani nikotinamidadenindinkleotid fosfat  
Na<sub>2</sub>EDTA - di-natrijum-etilendiaminotetraacetat-dihidrat  
NF-κB - nuklearni faktor κB  
NO<sub>2</sub> - azot-dioksid  
NOX2 - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza  
Nrf2 - nuklearni eritroid-2-vezan faktor-2  
NUDT1 - nudix hidrolaza T1  
O<sub>2</sub> - molekul kiseonika  
O<sub>3</sub> - ozon  
O<sub>2</sub><sup>·-</sup> - superoksid anjon radikal  
OH<sup>-</sup> - hidroksilni anjon  
OH<sup>·</sup> - hidroksilni radikal  
OR - 95% interval pouzdanosti (odd ratio)  
OSI - oksidativni indeks  
p - statistička značajnost  
PAU - policiklični aromatični ugljovodonic  
PCR - reakcija lančane polimerizacije (polymerase chain reaction)  
PCR-RFLP - metoda polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata  
P38MAPK - p38 mitogen-aktivirajuća protein-kinaza  
r - Pearsonov koeficijent  
ROC krive - receiver operating characteristics krive  
SIRT1 - sirtulin-1  
SO<sub>2</sub> - sumpor-dioksid  
SOD - superoksid-dismutaza  
TAC - ukupni antioksidativni kapacitet (Total Antioxidant Capacity)  
TAE pufer - tris-acetatni pufer  
TBE pufer - tris-boratni pufer  
TEMED - tetrametilen-diamid  
TNF-α - faktor nekroze tumora α  
TGF-β - transformišući faktor rasta β

TOS - ukupni oksidativni status (Total Oxidation Status)

TRIS - tris(hidroksimetil)aminometan

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

$\alpha$ 1-AT - alfa1-antitripsin

$\beta$  (S.E) - koeficijent regresije  $\beta$  (standardna greška za  $\beta$ )

$\chi^2$ -test - Chi-kvadrat test

8-OHdG - 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

8-oxodG - 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Hronična opstruktivna bolest pluća .....	1
1.2. Dijagnoza i klasifikacija hronične opstruktivne bolesti pluća .....	1
1.3. Značaj inflamacije i oksidativnog stresa u patogenezi hronične opstruktivne bolesti pluća .....	2
1.3.1. Uloga inflamacije u patogenezi HOBP .....	3
1.3.2. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi HOBP .....	4
1.4. Uloga faktora rizika spoljašnje sredine u patogenezi hronične opstruktivne bolesti pluća .....	11
1.4.1. Duvanski dim .....	11
1.5. Uloga genetskih faktora rizika u nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća .....	13
1.6. Interakcije genetskih i sredinskih faktora rizika u nastanku i razvoju HOBP .....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	19
3. MATERIJAL I METODE .....	21
3.1. Ispitanici .....	21
3.2. Uzorci .....	22
3.3. Demografski, antropometrijski i drugi podaci .....	23
3.4. Određivanje koncentracije rutinskih biohemijskih i hematoloških parametara .....	23
3.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa .....	23
3.5.1. Određivanje nivoa ukupnog oksidativnog statusa (TOS) u serumu .....	23
3.5.2. Određivanje nivoa ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) u serumu .....	26
3.5.3. Određivanje koncentracije 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina u urinu .....	28
3.6. Određivanje koncentracije kotinina u urinu .....	31
3.7. Metode za izolovanje genomske DNK .....	34

3.7.1. Izolovanje genomske DNK komercijalnim kitom .....	34
3.7.2. Izolovanje genomske DNK pomoću CTAB metode.....	34
3.8. Metode za detekciju genskih varijanti enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika .....	35
3.8.1. Detekcije genskih varijanti enzima GSTM1 i GSTT1 primenom metode reakcije lančanog umnožavanja DNK (PCR).....	36
3.8.2. Detekcije genskih varijanti: CYP1A1, GSTP1, mEPHS i mEPHF gena primenom metode polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP) .	38
3.9. Digestija produkata PCR reakcije .....	40
3.10. Provera prinosa/kvaliteta izolovane DNK i provera uspešnosti amplifikacije DNK primenom elektroforeze u agaroznom gelu.....	41
3.11. Elektroforeza DNK u nativnom gelu od poliakrilamida.....	42
3.12. Statistička analiza.....	43
4. REZULTATI.....	45
4.1. Uticaj oksidativnog stresa i izloženosti duvanskom dimu u nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća .....	45
4.1.1. Karakteristike ispitanika.....	45
4.1.2. Korelacije između parametara oksidativnog stresa, kotinina, indeksa telesne mase i godina starosti u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP ....	47
4.1.3. Analiza uticaja pušačkog statusa na nivoe kotinina, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP....	48
4.1.4. Analiza uticaja pola i pušačkog statusa na nivoe kotinina, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP .....	51
4.1.5. Analiza ROC krivih (Receiving Operating Characteristic Curves) za parametre izloženosti duvanskom dimu, antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa.....	54
4.1.6. Analiza prediktora za nastanak HOBP.....	57

4.1.7. Analiza kliničkih parametara pacijenata obolelih od HOBP prema težini bolesti .....	58
4.1.8. Korelacije između parametara plućne funkcije i parametara oksidativnog stresa kod pacijenata sa HOBP.....	60
4.1.9. Analiza uticaja pušačkog statusa i težine bolesti na nivoe kotinina, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod HOBP pacijenata .....	61
4.1.10. Analiza uticaja pušačkog statusa, pola i težine bolesti na nivoe kotinina, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod HOBP pacijenata .....	63
4.2. Genetski i ne-genetski faktori rizika za nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP).....	66
4.2.1. Karakteristike ispitanika.....	66
4.2.2. Analiza uticaja pola i pušačkih navika na nivo 8-oxodG/kreatinina u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP .....	70
4.2.3. Analiza uticaja indeksa telesne mase (BMI) na nivo 8-oxodG/kreatinina u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP .....	71
4.2.4. Analiza uticaja kumulativnog dejstva duvanskog dima i težine bolesti na nivo 8-oxodG/kreatinina .....	73
4.2.5. Analiza ROC krive (Receiving Operating Characteristic Curve) za 8-oxodG/kreatinin.....	74
4.2.6. Analiza funkcionalnih genskih varijanti enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika .....	76
4.2.6.1. Analiza složenih genotipova.....	77
4.2.7. Analiza udruženog efekta genetskih i ne-genetskih faktora rizika za nastanak i razvoj HOBP .....	80
4.2.7.1. Analiza povezanosti pušačkog statusa i ispitivanih genskih varijanti u nastanku HOBP .....	80
4.2.7.2. Analiza udruženog uticaja pola, pušačkog statusa i složenog GSTM1/GSTT1 genotipa na nastanak HOBP .....	82



4.2.7.3. Analiza uticaja genskih varijanti GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPH gena na nivo oksidativnog stresa kao faktora rizika za pojavu HOBP .....	83
4.2.7.4. Analiza uticaja genskih varijanti GSTM1, GSTT1, GSTP1, mEPH gena i pušenja na nivo oksidativnog stresa kao faktora rizika za pojavu HOBP .....	87
4.2.7.5. Analiza udruženog uticaja pušenja, oksidativnog stresa i aktivnosti mEPH fenotipova na parametre plućne funkcije .....	90
4.2.7.6. Analiza prediktora za nastanak HOBP .....	92
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>95</b>
5.1. Analiza uticaja oksidativnog stresa i izloženosti duvanskom dimu u nastanku i razvoju HOBP-a.....	95
5.2. Genetski faktori rizika i njihove interakcije sa sredinskim faktorima u nastanku i razvoju HOBP .....	105
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>114</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>117</b>

# **1. UVOD**

## **1.1. Hronična opstruktivna bolest pluća**

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je bolest koja se može prevenirati i lečiti, a karakteriše se ograničenim protokom vazduha koji je delom reverzibilan. Ovo ograničenje protoka vazduha je obično progresivno i udruženo sa hroničnim inflamatornim odgovorom na prisustvo štetnih čestica i gasova u disajnim putevima i plućima (1). Hronična opstruktivna bolest pluća se klinički ispoljava kao hronični opstruktivni bronhitis i emfizem pluća. Hronični opstruktivni bronhitis se definiše kao produktivni kašalj koji traje najmanje tri meseca, u poslednje dve ili više godina. Emfizem se definiše kao trajno povećanje vazdušnog prostora distalno od terminalnih bronhiola koje nastaje usled destrukcije zidova disajnih puteva (2).

HOBP je jedna od najčešćih hroničnih bolesti pluća i važan je uzrok mortaliteta i morbiditeta u svetu. Globalna prevalenca HOBP iznosi 11,7% (3). To je jedina bolest u prvih deset vodećih uzroka smrti u svetu, kod koje prevalenca i broj umrlih i dalje rastu. HOBP je identifikovana kao četvrti vodeći uzrok smrti u svetu (4), ali sa porastom prevalence pušenja i starenjem populacije, očekuje se da će do 2030. godine biti treći vodeći uzrok smrti (5). U Srbiji, HOBP je peti osnovni uzrok umiranja sa 2,6% smrtnih ishoda (6).

Glavni simptomi HOBP su kašljanje, iskašljavanje, dispneja, brzo i lako zamaranje bolesnika. Dispneja, kada se javi obično je perzistentna i progredirajuća. U početku je dispneja vezana za teže fizičke poslove, a kasnije se ispoljava pri sve manjim naporima, dok je na kraju otežano izvođenje i osnovnih aktivnosti dnevnog života (7).

## **1.2. Dijagnoza i klasifikacija hronične opstruktivne bolesti pluća**

Dijagnozu HOBP treba razmatrati kod svake osobe starije od 40 godina koja ima dispneju, hronični kašalj ili iskašljavanje i izložena je faktorima rizika, kao što su duvanski dim i drugi aerozagađivači. Pored navedenih simptoma i faktora rizika, za postavljanje dijagnoze HOBP neophodno je odrediti parametre respiratorne funkcije. Spirometrija predstavlja najjednostavniji, najobjektivniji i najreproduktivniji način za

otkrivanje i merenje smanjenja protoka vazduha kroz disajne puteve. To je neinvazivan i lako dostupan test koji se koristi za dijagnostikovanje i procenu težine HOBP. U cilju postavljanja dijagnoze HOBP, spirometrija obuhvata merenje forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi (FEV1) i forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC), kao i izračunavanje indeksa FEV1/FVC (Tiffeneau-Pinelli index). Za dijagnozu i procenu težine HOBP preporučuju se postbronhodilatatorne vrednosti spirometrijskih parametara. Vrednosti za FEV1 i FVC upoređuju se sa normalnim vrednostima predviđenim za određenu starosnu dob, pol, visinu i rasu, a izražavaju se u procentima od predviđene vrednosti. Osobe obolele od HOBP imaju smanjene postbronhodilatatorne vrednosti FEV1 i FEV1/FVC < 70%, a stepen smanjenja FEV1 odražava težinu HOBP. Prema najnovijim preporukama internacionalnog vodiča za dijagnozu, praćenje i prevenciju HOBP (1), spirometrijska klasifikacija bronhopneumonije (težine HOBP) izvršena je na osnovu vrednosti FEV1, kod svih pacijenata kod kojih je indeks FEV1/FVC < 70%, na:

- **GOLD I** – blaga HOBP sa vrednostima FEV1  $\geq$  80% od predviđenog,
- **GOLD II** – umerena HOBP sa vrednostima  $50 \leq$  FEV1  $\leq$  80% od predviđenog,
- **GOLD III** – teška HOBP sa vrednostima  $30 \leq$  FEV1  $\leq$  50% od predviđenog,
- **GOLD IV** – veoma teška HOBP sa vrednostima FEV1 < 30% od predviđenog.

Preciznija procena težine HOBP, pored spirometrijskih nalaza, zasniva se na proceni simptoma, rizika od egzacerbacija i postojanja komorbiditeta. Pacijenti koji imaju manje od dve egzacerbacije u toku godine imaju manji rizik, dok pacijenti sa dve i više egzacerbacija imaju veliki rizik za smrtni ishod (1).

### **1.3. Značaj inflamacije i oksidativnog stresa u patogenezi hronične opstruktivne bolesti pluća**

Hronična opstruktivna bolest pluća nastaje najčešće kao posledica interakcije više faktora rizika iz spoljašnje sredine i genetskih faktora rizika. Kao rezultat ovih interakcija dolazi do inflamacije i oksidativnog stresa koji imaju ključnu ulogu u patogenezi HOBP.

### 1.3.1. Uloga inflamacije u patogenezi HOBP

Jedna od najznačajnijih karakteristika HOBP je pojačan inflamatorni odgovor pluća na udahnute čestice i gasove, koji dovodi do oštećenja pluća (8). Smatra se da je duvanski dim glavni uzrok nastanka hronične inflamacije u plućima, mada i drugi faktori, kao što su izloženost štetnim faktorima spoljašnje sredine i radnog okruženja mogu imati značajan uticaj (9). Inflamatorni odgovor u HOBP uključuje urođeni i stečeni imunitet, koji su povezani sa aktivacijom dendritičnih ćelija (10). Duvanski dim i aerozagađenje pokreću inflamatorni odgovor u plućima, koji se manifestuje influsom inflamatornih ćelija, kao što su neutrofili, makrofage i T limfociti (prvenstveno CD8<sup>+</sup>) (11, 12).

Povećan broj aktiviranih neutrofila primećen je u sputumu HOBP-pacijenata. Hemotaktički agensi, kao što su interleukin (IL) 8, leukotrijeni (LT) B<sub>4</sub> i drugi citokini koje oslobađaju rezidentne ćelije, alveolarni makrofazi, epitelne ili endotelijalne ćelije, privlače neutrofile u respiratorni trakt (13). Povećane koncentracije hemotaktičnih faktora su primećene kod pacijenata obolelih od HOBP (14, 15). Duvanski dim utiče na smanjenu sposobnost fagocitoze neutrofila i time povećava rizik za nastanak respiratornih infekcija kod pušača i HOBP-pacijenata. Infiltracija neutrofila bi mogla biti kritična za razaranje pluća jer oni otpuštaju proteaze koje stimulišu sekreciju mukusa submukoznih žlezda i peharastih ćelija epitela. Dodatno, neutrofili predstavljaju glavni izvor hidrolitičkog enzima elastaze i pro-oksidanasa u plućima (16).

Kod HOBP-pacijenata primećen je povećan broj makrofaga u disajnim putevima, plućnom parenhimu i sputumu. Broj makrofaga je u korelaciji sa težinom HOBP (17). Makrofage oslobađaju reaktivne kiseonične radikale, prostaglandine, leukotrijene i razne proteaze. Povećan broj makrofaga u plućima HOBP-pacijenata i pušača mogao bi biti rezultat pojačanog privlačenja monocita iz cirkulacije kao odgovor na hemotaktične hemokine. Takođe, utvrđeno je da duvanski dim podstiče proliferativne sposobnosti makrofaga i smanjuje sposobnost fagocitoze apoptotskih neutrofila (16).

Kod HOBP-pacijenata primećen je povećan broj CD8<sup>+</sup> T limfocita i u pozitivnoj korelaciji je sa težinom bolesti. CD8<sup>+</sup> T limfociti otpuštaju TNF- $\alpha$ , perforine i granzime i na taj način indukuju apoptozu (15). Kod pacijenta sa emfizemom pluća

primećena je korelacija između CD8<sup>+</sup> T limfocita i povećane apoptoze alveolarnih epitelnih ćelija (18).

Dendritične ćelije imaju ključnu ulogu u povezivanju urođenog i stečenog imunskog odgovora. Pluća i disajni putevi sadrže bogatu mrežu dendritičnih ćelija koje signaliziraju udisanje štetnih agenasa. Dendritične ćelije mogu aktivirati imunske ćelije, kao što su neutrofil, makrofage, T i B limfociti, i na taj način učestvuju u plućnom odgovoru na duvanski dim i druge štetne agense. Povećana aktivnost dendritičnih ćelija je primećena u plućima HOBP-pacijenata (10).

### 1.3.2. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi HOBP

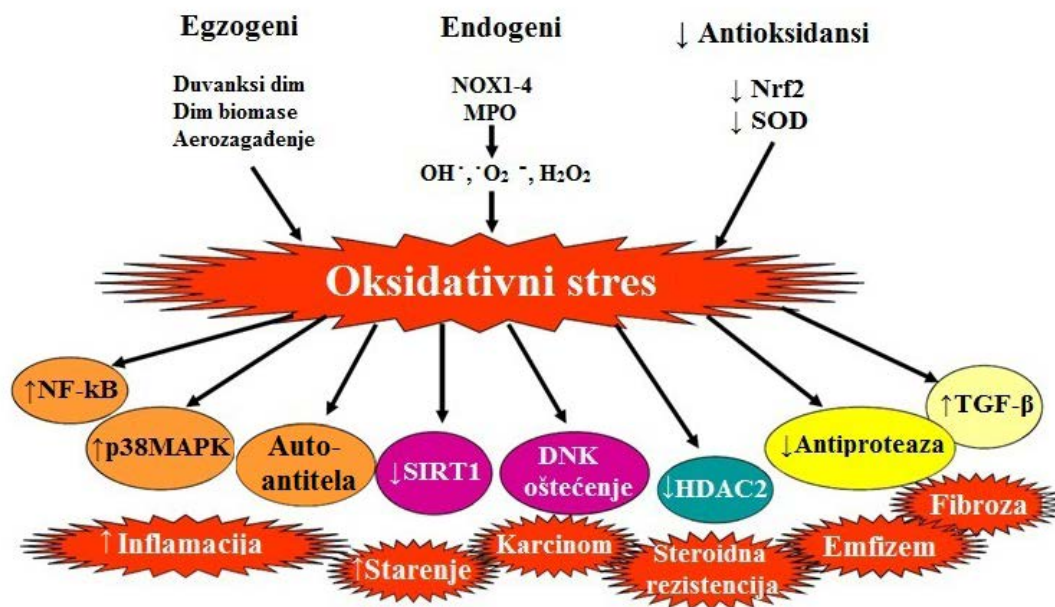
Oksidativni stres ima ključnu ulogu u nastanku HOBP jer, osim što dovodi do oštećenja plućnih struktura, podstiče ostale mehanizme koji su uključeni u patogenezu ove bolesti (Slika 1.) (15, 19). S obzirom da je respiratorni trakt u direktnom kontaktu sa spoljašnom sredinom, pluća su izuzetno osetljiva na povećanu izloženost slobodnim kiseoničnim radikalima.

Slobodni kiseonični radikali mogu biti egzogenog porekla, kao što je duvanski dim i zagađen vazduh i endogenog porekla (nastaju tokom katalitičkih reakcija nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH)-oksidaze (NOX2), ksantin-oksidaze, mijeloperoksidaze (MPO), kao i u prisustvu prelaznih metala) (20). Aktivirana NOX2 katalizuje reakciju redukcije kiseonika O<sub>2</sub> do superoksidnog anjona O<sub>2</sub><sup>·-</sup> koji se otpušta u fagolizozome (20):



U fagolizozomima, pod dejstvom mijeloperoksidaze (MPO), vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se prevodi u visoko oksidativnu hipohloritnu kiselinu. Dodatno, u prisustvu prelaznih metala, vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stvara reaktivne hidroksilne radikale (OH<sup>·</sup>, OH<sup>-</sup>). Zbog prisustva nesparenog elektrona, slobodni radikali su veoma reaktivni. U procesu oksidacije dolazi do prelaska slobodnog elektrona na druge molekule pri čemu dolazi do oštećenja ćelija, inaktivacije enzima i dodatnog stvaranja radikala. Duvanski dim predstavlja glavni uzrok nastanka oksidativnog stresa u plućima, s obzirom na činjenicu

da samo jedan udah sadrži preko  $10^{15}$  oksidanasa (21). Zaštitu od oksidanasa u plućima čine razni enzimski i neenzimski odbambeni sistemi (22). Nastanak oksidativnog stresa i njegova uloga u HOBP je prikazan na Slici 1. (15).



**Slika 1.** Nastanak oksidativnog stresa i njegova uloga u HOBP. (Preuzeto i adaptirano iz Barnes 2014) (15)

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; NOX-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza; MPO-mijeloperoksidaza;  $O_2^{\cdot-}$ -superoksid anjon radikal;  $OH^{\cdot}$ -hidroksilni radikal;  $H_2O_2$ -vodonik-peroksid; Nrf2-nuklearni eritroid-2-vezan faktor-2; SOD-superoksid-dismutaza; NF-κB-nuklearni faktor κB; p38MAPK-p38 mitogen-aktivirajuća protein-kinaza; SIRT1-sirtulin-1; HDAC2-histon deacetilaza; TGF-β-transformišući faktor rasta β.

Povećan nivo endogenih ili egzogenih oksidanasa ili smanjen nivo antioksidativne zaštite mogu dovesti do oksidativnog stresa. Povećan oksidativni stres u plućima je uključen u brojne patološke procese, kao što su prekid epitelne barijere, poremećen rad mukocilijarnog aparata, infiltracija inflamatornih ćelija u zidove disajnih puteva, inaktivacija antiproteaza i surfaktanata, kao i nakupljanje vezivnog tkiva u zidovima disajnih puteva. Svi ovi procesi dovode do smanjenja lumena disajnih puteva i posledično do smanjene funkcije pluća (Slika 1.) (15). Slobodni radikali imaju značajnu ulogu u procesima interćelijske signalizacije, proliferacije, apoptoze i imunskog odgovora. Oksidansi prisutni u duvanskom dimu stimulišu neutrofile i makrofage na produkciju slobodnih kiseoničnih radikala i oslobađanje medijatora inflamacije koji

privlače inflamatorne ćelije u pluća. Ovakva situacija je povezana sa povećanom aktivnošću nuklearnog faktora kB (NF-kB) (23) i p38 mitogen-aktivirajuće protein-kinaze (p38MAPK) (24) koji stimulišu transkripciju proinflamatornih gena i samim tim pojačavaju inflamaciju. Pojačana inflamacija proizvodi dalji oksidativni stres i na ovaj način dolazi do stvaranja začaranog kruga između oksidativnog stresa i inflamacije. Pod dejstvom oksidativnog stresa, epitelne ćelije proizvode veću količinu TGF- $\beta$ , koji dovodi do fibroze malih disajnih puteva, direktno ili putem oslobađanja faktora rasta vezivnog tkiva (8). Fibroza malih disajnih puteva, kao rezultat hronične inflamacije, značajno utiče na progresiju HOBP, što sugeriše da bi efikasna antiinflamatorna terapija mogla da spreči fibrozu. Međutim, pokazano je da oksidativni stres utiče i na efikasnost antiinflamatorne terapije. Smanjena ekspresija histon deacetilaze (HDAC2), usled povišenog oksidativnog stresa, dovodi do smanjenja kortikosteroidnog antiinflamatornog odgovora kod HOBP-pacijenata (25). Dodatno, smanjen nivo ekspresije HDAC2 enzima je u korelaciji sa težinom HOBP (26). Postoje brojni dokazi o povećanom oksidativnom stresu kod pušača i HOBP-pacijenata, što se objašnjava prisustvom visoke koncentracije slobodnih radikala u duvanskom dimu, kao i produkcijom slobodnih radikala iz aktiviranih neutrofila i makrofaga (8).

Neravnoteža između oksidansa i antioksidansa u plućima dovodi do oštećenja ćelijskih lipida, proteina i DNK, koja mogu uzrokovati oštećenja pluća ili izazvati niz ćelijskih odgovora putem stvaranja sekundarnih metaboličkih reaktivnih produkata. Lipidna peroksidacija nastaje oksidacijom višestruko nezasićenih masnih kiselina pri čemu su najosetljiviji membranski lipidi. Produkti peroksidacije lipida poseduju hemotaktička svojstva prema neutrofilima, aktiviraju ćelijsku proliferaciju, inhibiciju, apoptozu, brojne signalne puteve i indukuju ekspresiju proinflamatornih gena. Visok nivo produkata lipidne peroksidacije u sputumu HOBP-pacijenata je u korelaciji sa smanjenom vrednosti za FEV1 (8). Oksidacijom proteina dolazi do konformacionih promena i gubitka funkcije enzima, aktivacije transkripcionih i proteolitičkih sistema (19). Duvanski dim dovodi do direktnog oštećenje kolagena i elastina, koji čine glavne komponente matriksa pluća. Oksidativni stres dovodi do inhibicije  $\alpha$ 1-antitripsina, glavnog inhibitora neutrofilne elastaze. Povećanjem aktivnosti proteolitičkih enzima, duvanski dim utiče na degradaciju elastina i može dovesti do razvoja emfizema (8). U sputumu HOBP-pacijenata primećene su povišene vrednosti produkata oksidativnog

oštećenja proteina (27). Dodatno, oksidativni stres dovodi do stvaranja karbonilovanih proteina koji poseduju osobine antigena i mogu dovesti do stvaranja autoantitela kod HOBP-pacijenata (Slika 1.) (15, 28).

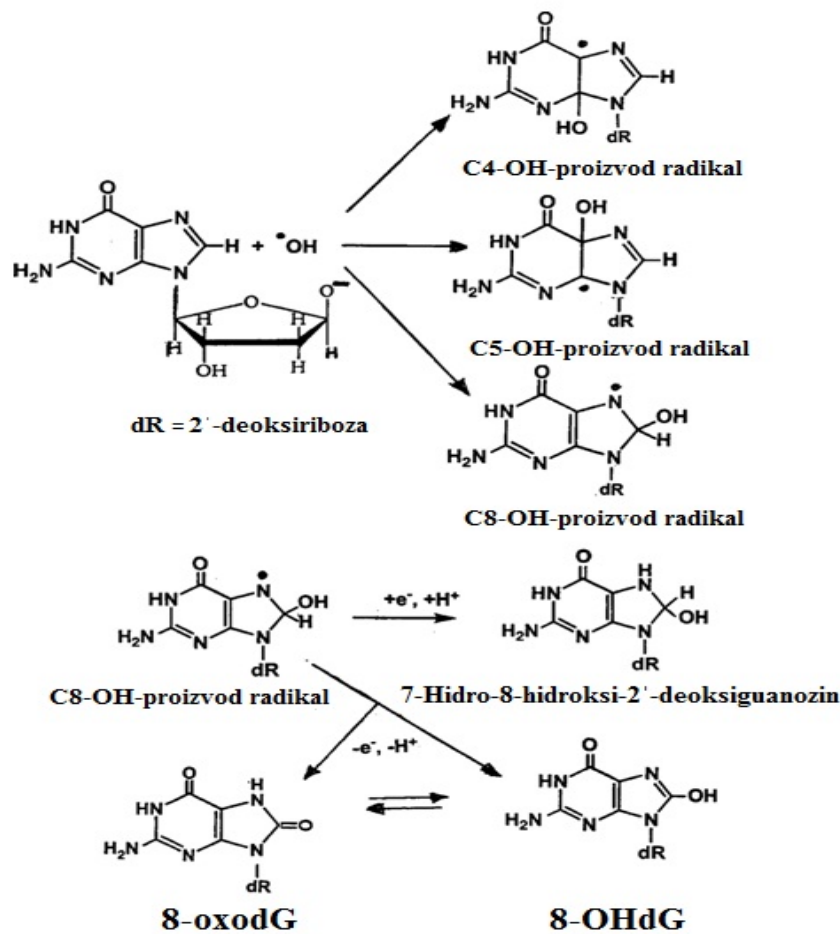
Jedna od bitnih posledica dejstva oksidativnog stresa je i ubrzano starenje. Oksidativni stres smanjuje ekspresiju i aktivnost sirtuina-1 (SIRT-1), koji predstavlja ključni reparirajući molekul, sa značajnom ulogom u procesu starenja (Slika 1.) (15). Značaj starenja u nastanku HOBP može biti objašnjen sniženim nivoom SIRT-1 kod HOBP-pacijenata (29). Pored toga, starenjem se smanjuje aktivnost telomeraza u endotelnim ćelijama što dovodi do skraćivanja telomera. U cirkulišućim leukocitima HOBP-pacijenata primećeno je povećano skraćivanje telomera kao posledica ubrzanog starenja (30).

Oksidativni stres najčešće dovodi do oštećenja ćelijske DNK. Izvori oštećenja mogu biti endogeni (spontane greške tokom DNK replikacije i reparacije, slobodni radikali nastali tokom aerobnog metabolizma) i egzogeni (jonizujuće i UV zračenje, duvanski dim, kancerogene supstance). Kontinuirano oksidativno oštećenje DNK učestvuje u patofiziologiji različitih bolesti i stanja, kao što su karcinom, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, hronična opstruktivna bolest pluća i starenje (Slika 1.) (15). Merenje nivoa urinarnih produkata oksidativnog oštećenja DNK (DNK lezije) je značajno za procenu sistemskih efekata oksidativnog oštećenja organizma, koje ima mutageni potencijal. Tokom oksidativnog oštećenja stvara se veći broj DNK produkata, među kojima su najviše zastupljeni produkti nukleobaznog oštećenja. Iako su sve DNK baze podložne oštećenju, guanin je najviše sklon oksidativnoj modifikaciji. Biomarker 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxodG), kao najobimnija DNK lezija, je najviše proučavan i prepoznat kao najbolji biomarker za procenu sistemskih efekata oksidativnog stresa. 8-oxodG se formira *in vivo* i njegov proces stvaranja je prikazan na Slici 2. (31).

U reakciji 2'-deoksiguanozina sa hidroksilnim radikalom (OH<sup>·</sup>) dolazi do hidroksilacije 2'-deoksiguanozina i stvaranja 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin radikala, koji oksidacijom prelazi u 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin. Nakon toga, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin podleže keto-enolnoj tautomeriji i nastaje oksidovani oblik 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin. S obzirom da 8-OHdG podleže keto-enolnoj tautomeriji koja



favorizuje stvaranje 8-oxodG-a, njegovog tautomernog oblika, 8-OHdG i 8-oxodG se odnose na isto jedinjenje (Slika 2.) (31).



**Slika 2.** Šematski prikaz sinteze 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oxodG) (Preuzeto i adaptirano iz Valavanidis et al. 2009) (31)

8-oxodG-8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; 8-OHdG-8-hidroksi-2'-deoksiguanozin.

Iako su aerobni biološki sistemi zaštićeni enzimskim i neenzimskim antioksidansima i specijalnim sistemima DNK reparacije, koji smanjuju nivo DNK oštećenja, kod njih je u svakom trenutku prisutan određeni nivo DNK oštećenja. Pored povećanog izlaganja slobodnim radikalima, endogenog ili egzogenog porekla, na povišen nivo cirkulišućeg 8-oxodG utiče i aktivnost enzima koji učestvuju u reparaciji DNK. Najznačajniji enzimi reparacije DNK uključuju familiju Nudix hidrolaza, enzime reparacije nukleotida i endonukleaze (32). Jedna od najznačajnijih Nudix hidrolaza, NUDT1, hidrolizuje 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin-trifosfat do 8-okso-2'-

deoksiguanozin-monofosfata koji se kao takav ne može ugraditi u genom. Dejstvom nukleotidaze 8-okso-2'-deoksiguanozin-monofosfat prelazi u 8-oxodG, koji se uklanja iz ćelija i izlučuje putem urina (33). Enzimi reparacije nukleotida stvaraju kompleks 8-oxodG-oligomer koji ne može biti ugrađen u genom, nego se eliminiše iz ćelija (34). Endonukleaze raskidaju fosfodiestarsku vezu unutar DNK i na taj način omogućavaju eliminaciju 8-oxodG iz genoma (35). Glavni izvor cirkulišućeg 8-oxodG i njegovog posledičnog pojavljivanja u urinu je *in vivo* reparacija oksidativno oštećene ćelijske DNK (32). Shodno ovome, nivo urinarne ekskrecije DNK lezija odražava usklađenost sledećih procesa u organizmu: stepen oksidativnog oštećenja DNK, brzinu prometa nukleinskih kiselina i aktivnost specifičnih enzima reparacije DNK (familija Nudix hidrolaza, enzimi reparacije nukleotida i različite endonukleaze) (32, 36, 37). Prednosti određivanja 8-oxodG u urinu jesu neinvazivan postupak prikupljanja biološkog uzorka (urina), jednostavna priprema uzorka, kao i visoka specifičnost i selektivnost koja se postiže prilikom merenja ovog biomarkera izokratskom HPLC-MS/MS metodom (38). Pored toga, ishrana i ćelijska smrt ne utiču na koncentraciju 8-oxodG u urinu, a takođe je veoma stabilan tokom dugotrajnog čuvanja (32, 39). Koncentracija 8-oxodG-a u urinu se obično izražava kao odnos 8-oxodG/kreatinin, gde se nivo kreatinina u urinu koristi za normalizaciju koncentracije ovog biomarkera u pojedinačnom uzorku urina (40, 41). S obzirom da je nivo urinarnih biomarkera obrnuto proporcionalan brzini protoka urina, normalizacijom se eliminiše uticaj varijacija u brzini protoka urina na nivo urinarnog 8-oxodG. Izražavanje nivoa 8-oxodG kao odnos 8-oxodG/kreatinin moguće je samo pod uslovom da je urinarno izlučivanje kreatinina konstanto, tj. da ne postoje inter- i intra-individualne razlike u izlučivanju kreatinina. Ovaj biomarker je evaluiran kao biomarker oksidativnog stresa izazvanog duvanskim dimom (42). Pokazano je da oksidativno oštećenje DNK, kao posledica sistemskih efekata oksidativnog stresa, ima značajnu ulogu u patogenezi nastanka HOBP (43). Kod HOBP-pacijenata primećene su značajno više vrednosti 8-OHdG u odnosu na zdrave ispitanike, bez obzira na pušački status (44). Visok nivo ovog biomarkera pozitivno korelira sa težinom pušenja, kao i sa težinom HOBP (45).

Produkciji i dejstvu oksidanasa u plućima suprostavlja se odbrambeni sistem antioksidanasa. Nivo intracelularnih antioksidanasa u plućima je znatno niži, za razliku od ekstracelularnog, koji se aktivira pod dejstvom oksidativnog stresa i ima glavnu

ulogu u antioksidativnoj zaštiti (46). U antioksidativnu zaštitu respiratornog trakta uključeni su enzimi (katalaza, superoksid-dismutaza (SOD), glutation-peroksidaza, glutation-S-transferaza, peroksi-redoksin, hem-oksigenaza-I-sistem) i neenzimski antioksidansi (vitamin C, vitamin E, mokraćna kiselina, liponska kiselina, urea, glutation, albumin, feritin) (47). Sintezu većine antioksidanasa reguliše transkripcijski faktor Nrf2, koji se aktivira dejstvom oksidativnog stresa. Međutim, HOBP-pacijenti uglavnom imaju nizak nivo antioksidativne zaštite jer se uprkos visokom nivou oksidativnog stresa, Nrf2 ne aktivira na adekvatan način, što može biti posledica povećanog acetilovanja usled nedostatka histon deacetilaze (HDAC2) (Slika 1.) (15, 48).

Status pro-oksidanasa ili anti-oksidanasa reflektuje red-oks homeostazu kod zdravog i obolelog organizma i upotpunjuje profil fizioloških i patofizioloških mehanizama. Nedostatak merenja pojedinačnih biomarkera oksidativnog stresa je nemogućnost uvida u sveukupni red-oks status organizma, s obzirom da su njihovi pro-oksidativni, odnosno anti-oksidativni efekti aditivni. Dodatno, pojedinačno merenje parametara oksidativnog stresa je dugotrajnije, skuplje i zahteva komplikovanije tehnike merenja. Zbog toga se za procenu red-oks statusa organizma najčešće koriste dva pristupa: prvi je merenje ukupnog oksidativnog statusa (Total Oxidation Status, TOS) i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (Total Antioxidant Capacity, TAC) (49, 50), a drugi pristup je izračunavanje oksidativnog indeksa (OSI). OSI je parametar koji ukazuje na odnos ukupnog oksidativnog i antioksidativnog kapaciteta (51).

Oksidativni stres se javlja kada izloženost oksidansima prevlada antioksidativnu zaštitu organizma. Kod HOBP-pacijenata sa povećanjem oksidanasa smanjuje se antioksidativna zaštita (52). Dokazan je viši nivo oksidativnog stresa (TOS i OSI) kod HOBP-pacijenata (53, 54). Povišen OSI je potvrda narušene ravnoteže između oksidanasa i antioksidativne zaštite kod HOBP-pacijenata. Kod pacijenata sa HOBP primećene su niže vrednosti ukupnog antioksidativnog kapaciteta u odnosu na kontrolne ispitanike (55, 56).

## 1.4. Uloga faktora rizika spoljašnje sredine u patogenezi hronične opstruktivne bolesti pluća

Pušenje se navodi kao glavni faktor rizika za nastanak HOBP (47). Pored pušenja, i drugi faktori, uključujući spoljašnje i unutrašnje zagađenje, socioekonomski status, ishranu i infekcije su značajni za patogenezu HOBP-a.

### 1.4.1. Duvanski dim

Duvanski dim predstavlja kompleksnu mešavinu nekoliko hiljada hemijskih jedinjenja koja imaju mutagene, citotoksične, karcinogene i antigene osobine (Slika 3.) (57).



**Slika 3.** Hemijski sastav duvanskog dima. (Preuzeto i adaptirano iz Lee et al. 2012) (57)

ROS - reaktivni kiseonični radikali.

U gasovitoj fazi, duvanski dim sadrži preko  $10^{15}$  reaktivnih molekula po jednom udahu, uključujući oksidanse kao što su superoksidni jon  $O_2^{\cdot-}$ , azotni oksidi i peroksinitriti. Katranska faza duvanskog dima sadrži organske radikale, koji imaju dug poluživot, poput semikvinonskih radikala, hidrosilnih radikala ( $OH^{\cdot}$ ,  $OH^{\ominus}$ ) i vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ). Pored slobodnih radikala, duvanski dim sadrži visoke koncentracije nikotina, ugljen-monoksida, amonijaka, acetaldehida, teških metala i drugih karcinogenih organskih molekula (Slika 3.) (57). Izlaganje duvanskom dimu dovodi do povećanog oksidativnog stresa u plućima, koji je uključen u brojne patološke procese koji dovode do nastanka HOBP (Slika 1.) (15). Oksidansi prisutni u duvanskom dimu stimulišu inflamatorne ćelije na produkciju slobodnih kiseoničnih radikala i oslobađanje

medijatora inflamacije koji dodatno privlače inflamatorne ćelije u pluća. Na ovaj način se objašnjava povezanost oksidativnog stresa i inflamacije u patogenezi HOBP (Slika 1.) (15).

Izloženost duvanskom dimu može biti procenjena kvalitativno i kvantitativno. Za kvalitativnu procenu koriste se upitnici sa podacima o pušačkim navikama ispitanika, mada im je vrednost limitirana nedovoljnim razumevanjem postavljenih pitanja, predrasudama, slabim pamćenjem ili nepažljivim odgovorima. Zbog toga, za preciznu procenu stepena izloženosti duvanskom dimu kvantitativno se određuju komponente duvanskog dima ili njegovih metabolita u biološkim uzorcima (58).

Nikotin je jedan od najjačih štetnih sastojaka duvanskog dima. Pri udisanju duvanskog dima, nikotin se vrlo brzo apsorbuje preko plućnih alveola, zahvaljujući velikoj površini alveola i rastvorljivosti nikotina u biološkim tečnostima. Nikotin se uglavnom razgrađuje u jetri (80-90%), a nešto manje u plućima i bubrezima (59). Oko 70-80% nikotina se metaboliše do kotinina (60). Nivo nikotina u krvi fluktuiraju, a urinarna ekskrecija nikotina je brza i zavisi od pH vrednosti i brzine protoka urina (61). Osim toga poluživot mu je oko dva sata, pa je zbog toga loš biomarker za praćenje izlaganja duvanskom dimu (62). Nasuprot tome, određivanje metabolita nikotina je značajnije za procenu izloženosti duvanskom dimu.

U procesu aktivnog pušenja nastaje ugljen-monoksid kao produkt nepotpunog sagorevanja duvana. Inhaliran ugljen-monoksid se brzo resorbuje u krv i vezuje za hemoglobin 200 puta jače nego za kiseonik, uz formiranje karboksihemoglobina. Merenja izdahnutog ugljen-monoksida i karboksihemoglobina u krvi koriste se za procenu izloženosti duvanskom dimu. Kratko poluvreme eliminacije, kao i povećana koncentracija ovih metabolita usled aerozagadenja, ograničava njihovu upotrebu kao biomarkera za procenu izloženosti duvanskom dimu (63, 64). Pored ovih metabolita, koncentracija tiocijanata u krvi se takođe koristi kao biomarker za razlikovanje pušača od nepušača (64). Međutim, zbog uticaja ishrane na nivo tiocijanata ovaj biomarker se danas ređe koristi (65).

Među brojnim predloženim biomarkerima, kotinin, kao glavni metabolit nikotina, pokazao je najveću osetljivost i specifičnost za procenu stepena izloženosti duvanskom dimu (66). Kako je kotinin metabolit nikotina specifičan samo za duvan, on se široko koristi i kao biomarker pasivnog pušenja jer obezbeđuje objektivnu procenu

izloženosti duvanskom dimu tokom prethodnih dva dana (67). Kotinin je stabilan u telesnim tečnostima, ima relativno dug poluživot (približno 16-18 časova) i slabije se vezuje za proteine plazme. Slobodno je distribuiran u svim tečnostima organizma i njegova distribucija je dozno-nezavisna. S obzirom da protok i pH vrednost urina ne utiču na koncentraciju kotinina, urin predstavlja najčešće korišćen biološki materijal za njegovo određivanje. Korekcija nivoa urinarnog kotinina prema koncentraciji kreatinina je u visokoj korelaciji sa nivoom ovog metabolita u plazmi (68). Prednosti kliničke primene urinarnog kotinina jeste neinvazivan postupak prikupljanja biološkog uzorka (urina) (69), kao i primena jednostavne, brze i osetljive metode za njegovu kvantifikaciju (70). Svi ovi faktori čine urinarni kotinin najboljim biomarkerom za procenu aktivnog i pasivnog izlaganja duvanskom dimu, u odnosu na druge biomarkere.

### **1.5. Uloga genetskih faktora rizika u nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća**

Pored faktora rizika poreklom iz spoljašnje sredine, značajnu ulogu u nastanku i razvoju HOBP imaju i genetski predisponirajući faktori rizika (71).

Urođeni deficit alfa-1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT) predstavlja jedan od dokazanih genetskih faktora rizika za pojavu HOBP. Alfa-1-antitripsin je inhibitor serin-proteaza i njegova glavna funkcija je inhibicija elastaze iz neutrofila-enzima koji učestvuje u degradaciji elastina. Neefikasna inhibicija neutrofilne elastaze dovodi do degradacije plućnog elastina i posledično do razvoja emfizema. Patogeneza emfizema, nastalog usled teškog deficita alfa-1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT), podrazumeva neravnotežu između proteaza i antiproteaza. Nasledni nedostatak alfa1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT) je odgovoran za ranu pojavu panobularnog emfizema (72, 73).

Genske varijante gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam ksenobiotika i odbranu od oksidativnog stresa, značajno utiču na individualnu osetljivost za nastanak HOBP. Detoksikacija štetnih supstanci se odvija putem složenog metabolizma ksenobiotika koji uključuje sistem enzima I i II faze. Tokom faze I, reakcije koje katalizuju CYP P-450 zavisne monooksigenaze (CYP P-450), štetne supstance se prevode u reaktivne intermedijere, dok se u fazi II vrši njihova

detoksikacija u reakcijama koje katalizuju glutation-S-transferaze (GSTs) i mikrozomalne hidrolaze epoksida (mEPHX) (74).

Citohrom P-450 sistem (CYP P-450), poznat kao sistem monooksigenaza, predstavlja superfamiliju hemoproteina koji katalizuju oksidativni metabolizam brojnih egzogenih i endogenih toksičnih supstanci. CYP P-450 enzimi katalizuju reakcije u kojima dolazi do hidroksilacije ugljenika i azota, oksidacije dvostruke veze, oksidacije heteroatoma, dehidrogenacije ugljovodonika i raskidanja C-C veze. Tokom ovih reakcija, toksične supstance se pretvaraju u visoko reaktivne elektrofilne intermedijere koji mogu biti mutageni i kancerogeni (75). CYP1A1, jedan od najbolje proučenih enzima iz ove familije, uključen je u metabolizam policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU) i heterocikličnih aromatičnih amina i amida koji su prisutni u visokim koncentracijama u duvanskom dimu. CYP1A1 katalizuje reakcije hidroksilacije i epoksidacije benzo[a]pirena, kancerogena prisutnog u duvanskom dimu, i dovodi do stvaranja benzo[a]piren-7,8-epoksida. S obzirom da duvanski dim utiče na indukciju CYP1A1, ovaj enzim je predominantno prisutan kod pušača (74). Gen za CYP1A1 se nalazi na hromozomu 15q22-24, i u okviru ovog gena opisano je nekoliko genskih varijanti, među kojima je najpoznatija T3801C (*MspI*). Supstitucija timidina sa cistidinom na poziciji 3801, u 3'flanking regionu gena CYP1A1, dovodi do promene enzimske aktivnosti ovog enzima. Alel 3801T je označen kao CYP1A1 \*1A, dok je 3801C označen kao CYP1A1 \*2A. Dokazano je da je CYP1A1 \*2A alel povezan sa dvostrukom aktivnošću enzima (76). Objavljeni rezultati o ulozi genske varijante CYP1A1 gena u nastanku HOBP su kontroverzni. Pokazano je da postoji udruženost CYP1A1 \*2A genske varijante sa nastankom HOBP (77, 78). Prisustvo genske varijante CYP1A1 \*2A u homozigotnom stanju predstavlja nezavisni faktor rizika za nastanak karcinoma pluća u populaciji Indije (79), dok je u kineskoj populaciji povezana sa veoma teškim oblikom HOBP (80). Međutim, u studijama sprovedenim u Brazilu, nije utvrđena povezanost genske varijante CYP1A1 gena sa nastankom HOBP (81) i karcinomom pluća (82).

Mikrozomalne hidrolaze epoksida (mEPH) predstavljaju enzime koji su uključeni u fazu II metabolizma ksenobiotika. One katalizuju reakcije hidrolize elektrofilnih, i prema tome potencijalno genotoksičnih, epoksida do manje reaktivnih hidrofilnih diola i imaju značajnu ulogu u odbrani pluća od oksidativnog stresa. Ovi

enzimi imaju značajnu ulogu u biotransformaciji kancerogena iz duvanskog dima, kao što su benzen i benzo[a]piren (83). Prevođenje benzo[a]piren-7,8 epoksida, nastalog pod dejstvom CYP P-450 enzima, u hidrofilniji benzo[a]piren-7,8-diol ukazuje na značajnu povezanost enzima I i II faze ksenobiotičkog metabolizma u detoksikaciji štetnih supstanci. Gen za mEPH nalazi se na hromozomu 1q42.1, i u okviru ovog gena su opisane dve genske varijante koje utiču na enzimsku aktivnost. Jedna dovodi do amino-kiselinske zamene tirozina sa histidinom na poziciji 113 polipeptidnog lanca (Tyr113His) i smanjenja enzimске aktivnosti za 40% (S-slow alel), dok druga dovodi do zamene histidina sa argininom na poziciji 139 (His139Arg) i povećanja enzimске aktivnosti za 25% (F-fast alel) (84). Prisustvo S alela u homozigotnom stanju (113His/113His) predstavlja rizik za nastanak HOBP (85, 86, 87). U brojnim studijama potvrđena je povezanost između Tyr113His varijante i nastanka HOBP (88, 89). Nasuprot tome, brojne studije nisu pokazale povezanost između genskih varijanti mEPH gena i nastanka HOBP (90, 91). Rezultati studije Li i saradnika (92) su pokazali da prisustvo His139Arg genske varijante ima protektivnu ulogu u nastanku HOBP u populaciji Azije, ali ne i u populaciji belaca. Na osnovu enzimске aktivnosti, kombinacije mEPHS i mEPHF genotipova se klasifikuju u tri fenotipa sa: niskom (His113His/His139His i Tyr113His/His139His), srednjom (Tyr113Tyr/His139His, Tyr113His/His139Arg i His113His/Arg139Arg) i visokom (Tyr113Tyr/His139Arg i Tyr113Tyr/Arg139Arg) aktivnošću (93). Nosioци genotipa sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću imaju povećan rizik za razvoj karcinoma pluća (94).

Glutation-S-transferaze čine složenu multigensku porodicu enzima koji katalizuju reakcije konjugacije redukovanoг glutationa sa različitim toksičnim elektrofilnim jedinjenjima, tokom druge faze metabolizma ksenobiotika. Tokom ovih reakcija stvaraju se hidrofilni netoksični konjugati koji se ekskretuju iz organizma (95).

GSTM1 i GSTT1, dva najvažnija izoenzima ove familije, imaju značajnu ulogu u detoksikaciji supstanci poreklom iz duvanskog dima. GSTM1 učestvuje u metabolizmu policikličnih aromatičnih ugljovodonik (PAU) epoksida, dok je GSTT1 uključen u metabolizam alkil-halogenida, kao što je dihlormetan. Gen za GSTM1 je smešten na hromozomu 1p13.3, a za GSTT1 na hromozomu 22p11.2. Genske varijante GSTM1 i GSTT1 dovode do delecije ovih gena i posledično do stvaranja GSTM1 \*nultog i GSTT1 \*nultog alela. Homozigotne delecije GSTM1 i GSTT1 gena su



povezane sa potpunim odsustvom enzimske aktivnosti (96). Pokazano je da postoji udruženost homozigotne delecije GSTM1 gena sa nastankom HOBP (97, 98). Dodatno, prisustvo GSTM1 \*nultog genotipa predstavlja rizik za razvoj HOBP, naročito u kombinaciji sa GSTT1 \*nultim genotipom (99). Prisustvo GSTT1 \*nultog genotipa predstavlja rizik za razvoj HOBP u populaciji muškaraca (100). Takođe, prisustvo samo GSTT1 \*nultog genotipa, ili u kombinaciji sa GSTM1 \*nultim genotipom dovodi do progresivnog pada FEV1 kod muškaraca, ali ne i kod žena (101).

GSTP1 enzim učestvuje u metabolizmu diol-epoksida nastalih tokom prve faze metabolizma ksenobiotika. Gen za GSTP se nalazi na hromozomu 11q13, i u okviru ovog gena opisana je genska varijanta koja dovodi do amino-kiselinske zamene leucina sa valinom na poziciji 105 koja uzrokuje različit afinitet enzima prema supstratu (102). Stoga, rezultati prethodnih studija o ulozi genske varijante Ile105Val u nastanku HOBP pokazuju niz kontradiktornosti. Pokazano je da Ile105 alel i Ile105Ile genotip predstavljaju faktore rizika za nastanak HOBP (103, 104). Nasuprot tome, u brojnim studijama utvrđena je povezanost Val105 alela i Val105Val genotipa sa nastankom HOBP (105, 106, 107, 108). U okviru studija, meta-analiza, Yang i saradnici nisu utvrdili udruženost GSTP1 genske varijante sa nastankom HOBP (109), dok su Smolonska i saradnici potvrdili zaštitnu ulogu ove varijante u nastanku HOBP, u azijskoj populaciji (110).

## **1.6. Interakcije genetskih i sredinskih faktora rizika u nastanku i razvoju HOBP**

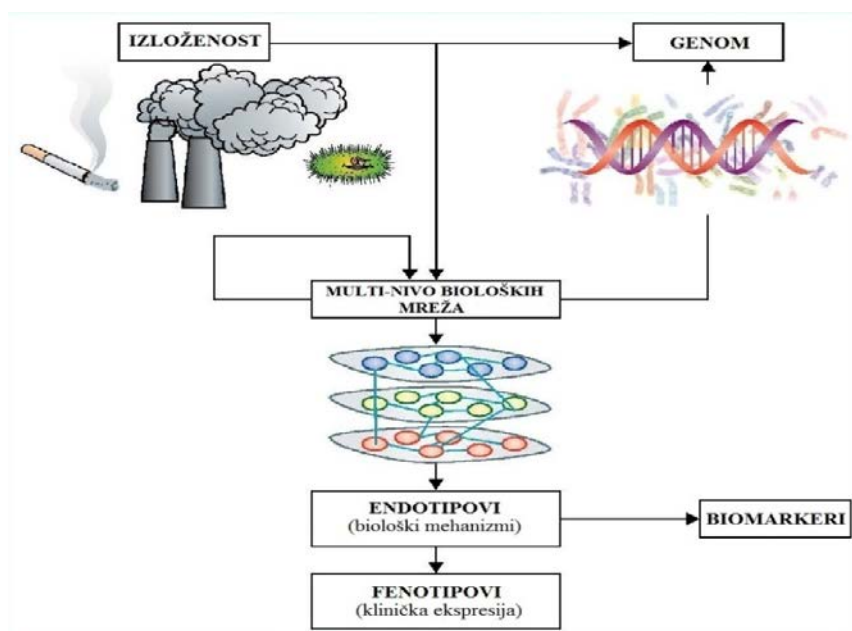
S obzirom da HOBP predstavlja složenu multifaktorsku bolest, i da veoma mali broj hroničnih pušača razvije simptomatsku HOBP, pretpostavlja se da interakcije genetskih i sredinskih faktora rizika imaju značajnu ulogu u njenom nastanku i razvoju.

Pušenje i zagađen vazduh predstavljaju najznačajnije faktore rizika za nastanak HOBP, poreklom iz spoljašnje sredine. Najvažnije aeroxagađivače predstavljaju: azot-dioksid (NO<sub>2</sub>), sumpor-dioksid (SO<sub>2</sub>), ozon (O<sub>3</sub>) i čestice izduvnih sistema. Na globalnom nivou, najviše koncentracije troposferskog azot-dioksida (NO<sub>2</sub>) primećene su u oblastima velike industrijalizacije (111).

Različita individualna osetljivost na oštećenja izazvana duvanskim dimom i aeroxagađenjem, uslovljena je razlikama u ispoljavanju fenotipa, što ukazuje na značaj

interakcija genetskih i sredinskih faktora rizika u nastanku HOBP. Interakcijom sredinskih i genetskih faktora rizika aktiviraju se različiti biološki mehanizmi koji, menjajući gensku aktivnost, dovode do razvoja endotipova koji utiču na ispoljavanje fenotipskih osobina. Identifikacija endotipa, određivanjem specifičnih biomarkera, može imati klinički značaj u dijagnostici i terapiji HOBP (Slika 4.) (112).

U identifikaciji značajnih interakcija genetskih i sredinskih faktora rizika primenjuju se dva pristupa. Prvi pristup podrazumeva ispitivanje i identifikaciju genskih varijanti, gena od interesa, i sredinskih faktora rizika u asocijativnim studijama. Drugi pristup podrazumeva identifikaciju hromozomskih regiona, uključenih u nastanak bolesti, i sredinskih faktora rizika na nivou populacije, koristeći studije blizanaca i porodične studije (111).



**Slika 4.** Povezanosti između gena, okruženja, endotipova, biomarkera i fenotipova  
(Preuzeto i adaptirano iz Agusti et al. 2017) (112)

Kod pacijenata sa niskim nivoom cirkulišućeg alfa1-antitripsina, primećeno je da pušenje dovodi do značajnog smanjenja vrednosti FEV1 (113). U studijama sprovedenim u Kini i Indiji, primećeno je da teški pušači, nosioci CYP1A1 \*2A alela, imaju povećan rizik za nastanak karcinoma pluća (79, 114). Značajan pad plućne funkcije primećen je kod HOBP-pušača sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću (115). Pušači oboleli od HOBP, koji su nosioci 113His alela u homozigotnom stanju, imaju

povećan rizik za razvoj teškog oblika HOBP (85, 98). U studiji sprovednoj u Indiji, primećen je značajan uticaj interakcije pušenja i prisustva His113His genotipa na nastanak karcinoma pluća (116). Dodatno, prisustvo mEPH genotipa sa niskom enzimskom aktivnošću predstavlja faktor rizika za nastanak karcinoma pluća u populaciji pušača (117). Prisustvo GSTM1 \*nultog genotipa, kod pušača, predstavlja značajan faktor rizika za nastanak HOBP (118). U dvema studijama (119, 120), utvrđena je povezanost homozigotnog GSTM1 \*nultog genotipa sa razvojem teškog hroničnog bronhitisa kod pušača. He i saradnici (121) su pokazali da je kod pušača, sa pozitivnom porodičnom istorijom HOBP, prisustvo Ile105Ile GSTP1 genotipa povezano sa ubrzanim padom FEV1 i drugim parametrima plućne funkcije.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je da se utvrde genetski i ne-genetski faktori rizika povezani sa oksidativnim stresom koji je odgovoran za nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) u populaciji Srbije. Takođe, cilj je da se utvrdi potencijalni značaj biomarkera koji su povezani sa oksidativnim stresom u dijagnostici i predikciji težine HOBP-a. Predloženi ciljevi su realizovani kroz sledeća istraživanja:

- Ispitivanje razlike u koncentracijama biohemijskih, hematoloških i parametara za procenu težine oksidativnog stresa u serumu i urinu svih zdravih ispitanika i pacijenata sa HOBP-om, kao i uticaj pola, godina, i pušačkog statusa na ove razlike;
- Ispitivanje uticaja pušačkog statusa i indeksa telesne mase (BMI) na nivo oksidativnog stresa (procenjenog na osnovu urinarnog biomarkera 8-oxodG/kreatinina) u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP-om;
- Ispitivanje udruženog efekta oksidativnog stresa (procenjenog na osnovu urinarnog biomarkera 8-oxodG/kreatinina) i kumulativnog efekta pušenja (procenjenog na osnovu indeksa paklo/godine) na nastanak i razvoj HOBP-a;
- Ispitivanje uticaja stepena izloženosti nikotinu (procenjenog na osnovu koncentracije metabolita nikotina: kotinina u urinu) i oksidativnog stresa (procenjenog pomoću serumskih biomarkera: ukupni oksidativni status i ukupni antioksidativni kapacitet) na nastanak i razvoj HOBP-a, kao i analiza ovih uticaja u različitim polnim grupama;
- Ispitivanje udruženog uticaja oksidativnog stresa (procenjenog pomoću serumskih biomarkera: ukupni oksidativni status i ukupni antioksidativni kapacitet), pola i pušačkog statusa na nastanak i razvoj HOBP-a;
- Određivanje graničnih vrednosti za parametre oksidativnog stresa u razlikovanju pacijenata sa HOBP-om od zdravih ispitanika;
- Ispitivanje genskih varijanti enzima povezanih sa oksidativnim stresom (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPHX), sa ciljem utvrđivanja

distribucije alela, genotipova i kombinacija genotipova u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP-om;

- Utvrđivanje odstupanja distribucije genotipova enzima (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPHX) od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP-om;
- Ispitivanje povezanosti između genskih varijanti ispitivanih enzima (CYP1A1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPHX) i sklonosti za nastanak i razvoj HOBP-a;
- Ispitivanje udruženog uticaja pola, pušačkog statusa, oksidativnog stresa (procenjenog na osnovu urinarnog biomarkera 8-oxodG/kreatinina) i genskih varijanti ispitivanih enzima na nastanak i razvoj HOBP-a;
- Određivanje genetskih i ne-genetskih nezavisnih prediktora za nastanak HOBP-a u celoj populaciji, kao i u različitim polnim grupama;
- Ispitivanje potencijalnog značaja biomarkera oksidativnog stresa u dijagnostici i predikciji težine HOBP-a.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ispitanici

Prvi deo studije je obuhvatio grupu od 124 pacijenta obolela od HOBP (73 muškarca i 51-u ženu, prosečne starosti  $64,88 \pm 8,10$  godina) i 173 kontrolna ispitanika (107 muškaraca i 66 žena, prosečne starosti  $52,27 \pm 14,98$  godina). Pacijenti su dijagnostikovani u Klinici za pulmologiju, Kliničkog centra-Kragujevac u Kragujevcu, kao i u Odeljenju pulmologije, Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara” u Beogradu. Kontrolnu grupu su činili zdravi ispitanici koji su se dobrovoljno uključili u studiju tokom redovnog sistematskog pregleda koji je obavljen na Medicini rada, organizacionoj jedinici Doma zdravlja „Stari grad”, u Beogradu.

U drugi deo studije uključen je 71 pacijent oboleo od HOBP (33 muškarca i 38 žena, prosečne starosti  $57,39 \pm 7,61$  godina) i 153 kontrolna ispitanika (85 muškaraca i 68 žena, prosečne starosti  $45,98 \pm 10,17$  godina). Pacijenti su regrutovani na Klinici za plućne bolesti, Kliničkog centra Srbije, u Beogradu. Kontrolnu grupu su činili zdravi ispitanici koji su se dobrovoljno uključili u studiju tokom redovnog sistematskog pregleda koji je obavljen na Medicini rada, Doma zdravlja „Stari grad” u Beogradu i preventivnih pregleda koji su obavljeni u Opštoj bolnici Pančevo u Pančevu.

Kod svih pacijenata, hronična opstruktivna bolest pluća je dijagnostikovana od strane lekara-specijaliste za plućne bolesti. Klinička dijagnoza HOBP je postavljena na osnovu zvaničnih preporuka za dijagnozu i lečenje HOBP (122). Mereni su parametri plućne funkcije: forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1), forsirani vitalni kapacitet (FVC) i odnos forsiranog ekspiratornog volumena u prvoj sekundi i forsiranog vitalnog kapaciteta (Tiffneau indeks ili FEV1/FVC). Dobijeni rezultati su izraženi u procentima u odnosu na vrednosti koje su normalne za uzrast, pol i visinu (% od predviđene vrednosti, FEV1% i FVC%). Za određivanje parametara FEV1 i FVC korišćena je metoda spirometrije, primenom aparata: Ganshorn PowerCube LF8,5F. Kriterijum za postavljanje dijagnoze je bio spirometrijski nalaz: FEV1/FVC < 70% i FEV1 < 80% od predviđenih vrednosti. Za klasifikaciju težine HOBP su primenjene preporuke internacionalnog vodiča za dijagnozu, praćenje i prevenciju HOBP (122).

Prema ovim preporukama, stadijumi oštećenja protoka vazduha kroz disajne puteve (težina HOBP) su definisani prema vrednostima za FEV1 (Tabela 1.).

**Tabela 1.** Klasifikacija težine HOBP prema GOLD preporukama

Oznaka	Težina HOBP	FEV1%
GOLD 1	blaga	$\geq 80$
GOLD 2	umerena	50 - 80
GOLD 3	teška	30 - 50
GOLD 4	veoma teška	$\leq 30$

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; GOLD-Globalna inicijativa za hroničnu opstruktivnu bolest pluća; FEV1-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi.

Kontrolne grupe su obuhvatile zdrave ispitanike kod kojih je isključeno prisustvo HOBP i drugih akutnih i hroničnih bolesti na osnovu anamnestičkih podataka, normalnih vrednosti laboratorijskih rezultata, fizičkog pregleda i auskultacije pluća.

Osnovne informacije vezane za ispitanike (pol, godine starosti, pušački status) su prikupljene popunjavanjem odgovarajućih upitnika. Parametar intenziteta pušenja koji se koristi za procenu kumulativnog štetnog dejstva duvanskog dima ili intenziteta pušenja je indeks paklo/godine, i predstavlja količnik između godina pušačkog staža i broja popušanih cigareta na dan, izražen u paklama cigareta [paklo/godine=godine pušačkog staža x (broj popušanih cigareta dnevno/20)].

Ispitanici su bili upoznati sa ciljem studije i dobrovoljno su se saglasili da učestvuju u studiji, što su i potvrdili svojim potpisom. Istraživanje je sprovedeno prema etičkim principima Helsinške deklaracije i odobreno je od strane Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (2509/2), a na osnovu prethodne saglasnosti svih medicinskih ustanova koje su učestvovala u studiji.

### 3.2. Uzorci

Za analizu su korišćeni uzorci venske krvi ispitanika, koji su prikupljeni posle noćnog gladovanja. Rutinski biohemijski i hematološki parametri su određeni istog dana nakon uzorkovanja. Za određivanje biohemijskih biomarkera i biomarkera oksidativnog

stresa (ukupni oksidativni status i ukupni antioksidativni kapacitet) korišćen je serum, dobijen nakon centrifugiranja na 2500 obr/min tokom 15 minuta. Nakon izdvajanja seruma i analize rutinskih biohemijskih parametara, serum za merenje parametara oksidativnog stresa je podeljen u alikvote i zamrznut na -80 °C do izvođenja analize.

Za izolovanje DNK, uzorci periferne krvi su uzimani sa 3,8% natrijum-citratom kao antikoagulansom i čuvani na -20 °C, do izvođenja analize.

Za analizu kotinina, 8-oxodG i kreatinina prikupljen je prvi jutarnji urin, srednjeg toka. Uzorci su centrifugirani na 3500 obr/min tokom 15 minuta i nakon odlivanja bistrog supernatanta zamrznuti na -80 °C do izvođenja analize.

### **3.3. Demografski, antropometrijski i drugi podaci**

Za prikupljanje podataka korišćen je upitnik. Za svakog ispitanika prikupljeni su sledeći podaci: pol, uzrast, pušački status (pušač, nepušač, bivši pušač), intenzitet pušenja (paklo/godine), antropometrijski parametri visina, težina i izračunat je indeks telesne mase:  $BMI = \text{težina (kg)} / \text{visina}^2 \text{ (m}^2\text{)}$ .

### **3.4. Određivanje koncentracije rutinskih biohemijskih i hematoloških parametara**

Biohemijski parametri su određivani u serumu i mereni na biohemijskim analizatorima (Instrumentation Laboratory<sup>®</sup> Ilab 650, Beckman Synchron CX9 Pro). Hematološki parametri su određivani u punoj krvi i mereni na hematološkom analizatoru (Coulter<sup>®</sup> HmX).

### **3.5. Određivanje parametara oksidativnog stresa**

#### **3.5.1. Određivanje nivoa ukupnog oksidativnog statusa (TOS) u serumu**

Sadržaj ukupnih oksidanasa u serumu određivan je primenom metode po Erel-u (49), koja je aplikovana na automatskom analizatoru. Analiza je zasnovana na oksidaciji fero jona u feri jon u prisustvu različitih reaktivnih kiseoničnih vrsta u kiseloj sredini. Nastali feri jon u reakciji sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini gradi obojeni kompleks



sa apsorpcionim maksimumom na 560 nm. Reakcija oksidacije je olakšana molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu.

#### Hemikalije i reagensi:

- **TOS 1 reagens:** pripremljen je rastvaranjem ksilenol-oranža (Sigma-AldrichCo) (114 mg) i natrijum-hlorida (8,18 g) u 900 mL rastvora sumporne kiseline (c=25 mmol/L). U pripremljen rastvor dodato je 100 ml glicerola. pH vrednost je podešena na 1,75.
- **TOS 2 reagens:** pripremljen je rastvaranjem feroamonijum sulfata (Sigma-AldrichCo) (1,96 g) i o-dianizidin dihidrohlorida (Sigma-AldrichCo) (3,17 g) u 1000 mL rastvora sumporne kiseline (c=25 mmol/L).
- **Standardni rastvor:** rastvor vodonik-peroksida (c=200 µmol/L)  
 Osnovni rastvor vodonik-peroksida (c=10 mmol/L) je pripremljen iz 7,75 µL rastvora vodonik-peroksida (30%) u koji je dodata destilovana voda do 10 mL rastvora. Standardni rastvor vodonik-peroksida (c=200 µmol/L) je pripremljen neposredno pre analize, razblaživanjem osnovnog rastvora vodonik-peroksida (c=10 mmol/L) 50 puta.

Postupak određivanja ukupnog oksidativnog stausa (TOS) u serumu prikazan je u Tabeli 2.

**Tabela 2.** Postupak određivanja ukupnog oksidativnog statusa (TOS) u serumu

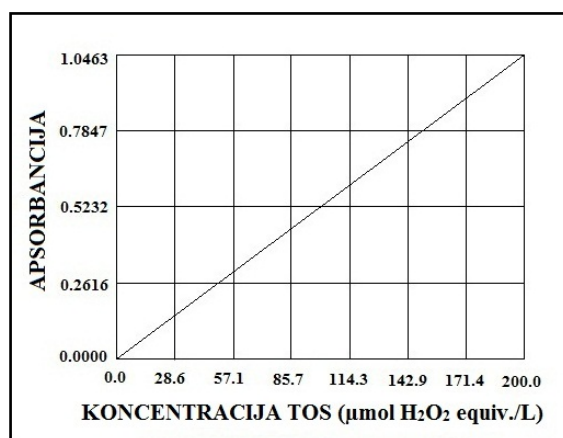
	Slepa proba (µL)	Standard (µL)	Analiza (µL)
<b>TOS 1 reagens</b>	225	225	225
<b>TOS 2 reagens</b>	25	25	25
<b>Destilovana voda</b>	35	-	-
<b>Standard</b>	-	35	-
<b>Uzorak</b>	-	-	35
U reakcionoj kivetki se pomešaju sve komponente, inkubira se 3-4 minuta i očitava se apsorbanca na 540 nm			

TOS-ukupni oksidativni status.

Koncentracije TOS-a su određene primenom metode standardne kalibracione krive. Kalibracija metode je vršena standardnim vodenim rastvorom vodonik-peroksida koncentracije 200 µmol/L. Kalibracija je vršena u jednoj tački i na osnovu izmerene apsorbanca standarda i njegove poznate koncentracije, konstruisana je standardna kalibraciona kriva. Standardna kalibraciona kriva je zadovoljavala uslove linearne

regresione analize i na osnovu izmerenih apsorbancija analiza, dobijena je koncentracija TOS-a u uzorcima. Destilovana voda je korišćena kao slepa proba u analizi. Intenzitet boje rastvora izmeren na 540 nm, srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih oksidanasa u uzorku. Dobijeni rezultati predstavljaju koncentraciju ukupnog oksidativnog statusa i izraženi su u  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L. Grafik standardne krive za određivanje TOS je prikazan na Slici 5.

Određivanje ukupnog oksidativnog statusa (TOS) vršeno je na analizatoru AU 400 (Beckman Coulter, Inc, Brea, USA). Parametri za određivanje TOS na automatskom analizatoru prikazani su na Slici 6.



**Slika 5.** Standardna kalibraciona kriva za određivanje TOS

Specific Test Parameters			
General	LIH	ISE	Range
Test Name:	TOS		Operation: Yes
Sample:	Volume: 35.0 $\mu\text{L}$	Dilution: 0 $\mu\text{L}$	Pre-Dilution Rate: 1
Reagents:	R1 Volume: 225 $\mu\text{L}$	Dilution: 0 $\mu\text{L}$	Min OD: L
	R2 Volume: 25 $\mu\text{L}$	Dilution: 0 $\mu\text{L}$	Max OD: H
Wavelength:	Pri. 540	Sec. 800	Reagent OD limit: First L: -2.0000, First H: 2.5000
Method:	END		Last L: -2.0000, Last H: 2.5000
Reacting slope:	+		Dynamic Range: Correlation Factor: -999999.9, H: 999999.9
Measuring Point 1:	First: 0	Last: 23	A: 1.00000000, B: 0.00000000
Measuring Point 2:	First: 0	Last: 10	On-board stability period:
Linearity:	%		
No Lag Time:			

**Slika 6.** Aplikacija za određivanje ukupnog oksidativnog statusa (TOS) na analizatoru AU 400 (Beckman Coulter, Inc, Brea, USA)

### 3.5.2. Određivanje nivoa ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) u serumu

Ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) je određivan automatskom metodom po Erelu (50). Analiza je zasnovana na oksidaciji stabilnog hromogena, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline (ABTS), do odgovarajućeg katjona ( $ABTS^{•+}$ ) uz pomoć vodonik-peroksida u kiseloj sredini, pri čemu nastaje smaragdna boja. Kada na obojeni jon  $ABTS^{•+}$  deluju antioksidansi iz uzorka, on se redukuje do bezbojnog ABTS-a, što se manifestuje smanjenjem intenziteta boje na 660 nm. Obezbojavanje  $ABTS^{•+}$  jona je proporcionalno sa koncentracijom i antioksidativnim kapacitetom antioksidanasa iz uzorka. Za standardizaciju metode koristi se Trolox, hidrofilni analog vitamina E (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina).

#### Hemikalije i reagensi:

- **TAC 1 reagens:** Acetatni pufer ( $c=0,4$  mol/L,  $pH=5,8$ )  
Acetatni pufer je pripremljen mešanjem 940 mL natrijum-acetata ( $c=0,4$  mol/L) i 60 mL sirćetne kiseline ( $c=0,4$  mol/L) za 1000 mL rastvora. Pripremljen reagens je stabilan 6 meseci na  $+4^{\circ}C$ .
- **TAC 2 reagens:** je pripremljen mešanjem 30 mL acetatnog pufera ( $c=30$  mmol/L,  $pH=3,6$ ) i 70 mL rastvora vodonik-peroksida ( $c=2$  mmol/L). Potom se 0,549g ABTS-a (Sigma-AldrichCo) rastvori u 100 mL prethodno pripremljenog rastvora (finalna koncentracija ABTS-a iznosi 10 mmol/L). Rastvor se zatim inkubira 1h na sobnoj temperaturi dok se ne javi karakteristična plavo-zelena boja  $ABTS^{•+}$  jona. Reagens je stabilan 6 meseci na  $+4^{\circ}C$ .
- **Standardni rastvor:** rastvor Trolox-a (Sigma-AldrichCo) ( $c=2$  mmol/L)  
Rastvor Trolox-a je pripremljen rastvaranjem 0,0005g Trolox-a u 10 mL fosfatnog pufera ( $c=30$  mmol/L,  $pH=7,4$ ).

Postupak određivanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta u serumu prikazan je u Tabeli 3.

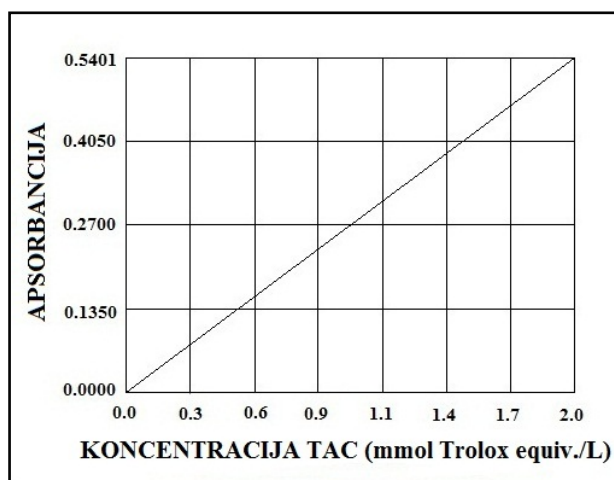
**Tabela 3.** Postupak određivanja ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) u serumu

	Slepa proba (μL)	Standard (μL)	Analiza (μL)
<b>TAC 1 reagens</b>	200	200	200
<b>TAC 2 reagens</b>	25	25	25
<b>Destilovana voda</b>	5	-	-
<b>Standard</b>	-	5	-
<b>Uzorak</b>	-	-	5

U reakcionoj kiveri se pomešaju sve komponente, inkubira se 5 minuta na 37°C i očitava apsorbancija na 660 nm

TAC-ukupni antioksidativni kapacitet.

Koncentracije TAC-a su određene primenom metode standardne kalibracione krive. Kao standard korišćen je hidrosolubilni analog vitamina E, Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina), rastvoren u fosfatnom puferu ( $c=30$  mmol/L,  $pH=7,4$ ). Kalibracija je vršena u jednoj tački i na osnovu izmerene apsorbance standarda i njegove poznate koncentracije (Trolox,  $c=2$  mmol/L), konstruisana je standardna kriva. Standardna kalibraciona kriva je zadovoljavala uslove linearne regresione analize i na osnovu izmerenih apsorbancija analiza, dobijena je koncentracija TAC-a u uzorcima. Destilovana voda je korišćena kao slepa proba u analizi. Intenzitet obezbojavanja rastvora izmeren na 660 nm, srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Dobijeni rezultati predstavljaju koncentraciju ukupnog antioksidativnog kapaciteta i izraženi su u mmol Trolox equiv./L. Grafik standardne krive za određivanje TAC je prikazan na Slici 7.



**Slika 7.** Standardna kalibraciona kriva za određivanje TAC

Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) vršeno je na automatskom analizatoru AU 400 (Beckman Coulter, Inc, Brea, USA). Parametri za određivanje TAC na automatskom analizatoru prikazani su na Slici 8.

Specific Test Parameters										
General		LIH		ISE		Range				
Test Name:	TAC		<		>		Type:	Serum		
							Operation:	Yes		
Sample:	Volume	5.0	µL	Dilution	0	µL	Pre-Dilution Rate:	1		
Reagents:	R1 Volume	200	µL	Dilution	0	µL	Min OD	Max OD		
	R2 Volume	25	µL	Dilution	0	µL	L	H		
Wavelength:	Pri.	660		Sec.			Reagent OD limit:			
Method:	END						First L	-2.0000	First H	2.5000
Reacting slope:	-						Last L	-2.0000	Last H	2.5000
Measuring Point 1:	First	0		Last	26		Dynamic Range:			
Measuring Point 2:	First	0		Last	10		Correlation Factor:	-999999.9	H	999999.9
Linearity:							A	1.00000000	B	0.00000000
No Lag Time:							On-board stability period:			

**Slika 8.** Aplikacija za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) na analizatoru AU 400 (Beckman Coulter, Inc, Brea, USA)

### 3.5.3. Određivanje koncentracije 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina u urinu

Za procenu sistemskog efekta oksidativnog stresa kod ispitanika su određene koncentracije parametra oksidativne modifikacije DNK, 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina (8-oxodG). Za merenje koncentracije 8-oxodG korišćen je prvi jutarnji urin, primenom metode po Lee-u i saradnicima (38). Metoda se odlikuje visokom osetljivošću i jednostavnom pripremom uzorka. Princip metode je direktno, neizotopsko merenje parametra 8-oxodG, primenom izokratične HPLC-MS/MS metode (kombinovana tehnika visoko osetljive tečne hromatografije pod visokim pritiskom i masene spektrometrije).

#### Hemikalije i reagensi:

- 8-oxodG (Sigma-AldrichCo)
- amonijum-acetat (Sigma Ultra, Sigma-AldrichCo)
- acetonitril (Sigma-AldrichCo)
- voda (Milli-Q kvaliteta)

### **Piprema mobilne faze:**

Za analizu, kao mobilne faze korišćeni su rastvori amonijum-acetata i acetonitrila. Amonijum-acetat, 10 mM rastvor je pripremljen rastvaranjem 771 mg amonijum-acetata u 1L vode. pH vrednost rastvora amonijum-acetata (pH=4,3) je podešena dodatkom sirćetne kiseline. Amonijum-acetat i acetonitril su mešani u zapreminskom odnosu 96,4:3,6. Pripremljene mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane kroz najlon filter (0,2  $\mu\text{m}$ ).

### **Priprema osnovnog i radnih rastvora standardne supstance:**

- Osnovni rastvor 8-oxodG, oko  $c=7$  mmol/L, pripremljen je rastvaranjem 1 mg 8-oxodG-a u 0,5 mL vode.
- Razblaženi rastvor 8-oxodG, od oko  $c=7$   $\mu\text{mol/L}$ , pripremljen je mešanjem 1  $\mu\text{L}$  osnovnog rastvora 8-oxodG ( $\sim c=7$  mmol/L) i 999  $\mu\text{L}$  vode, za 1 mL rastvora. Tačna koncentracija ovog rastvora utvrđena je spektrofotometrijski na aparatu Ultraspec 3300pro UV/Vis Scanning Spectrophotometer (Amersham Biosciences) i koristeći poznate vrednosti za ekstinkciju 8-oxodG ( $\epsilon$  12,300 at 245 nm).
- Radni rastvor 8-oxodG ( $c=1200$  nmol/L) je pripremljen iz razblaženog rastvora, neposredno pre analize, mešanjem odgovarajuće zapremine vode i razblaženog rastvora 8-oxodG ( $c=7$   $\mu\text{mol/L}$ ) kako bi se dobila tačna radna koncentracija 8-oxodG od 1200 nmol/L. Radni rastvor je dalje korišćen za pripremu standardnih rastvora različitih koncentracija 8-oxodG ( $c=0$ ; 7,5; 15,0; 30,0; 60,0; 120,0 nmol/L) u vodi i pool-u urina zdravih ispitanika.

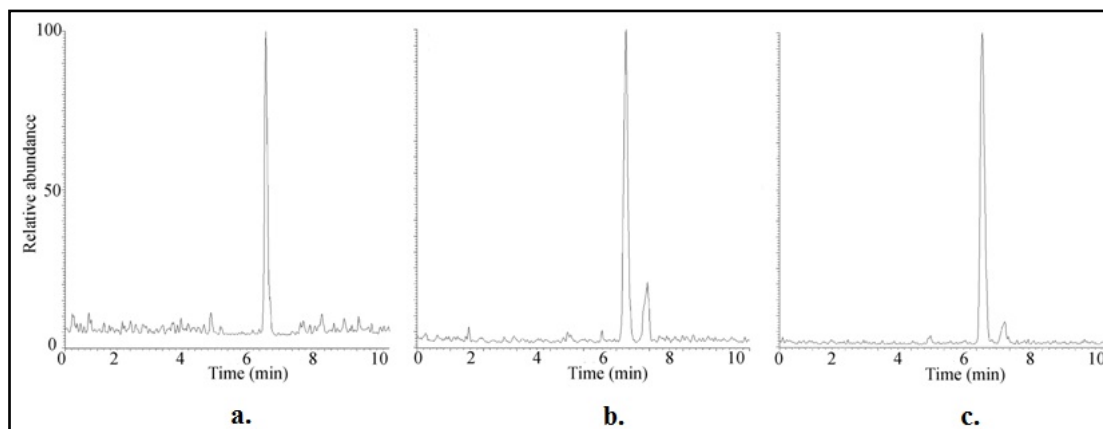
### **Uslovi HPLC-MS/MS analize:**

- Kolona: Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ (3  $\mu\text{m}$ , 100 L $\times$ 4.6 mm ID)
- Mobilna faza (A): amonijum-acetat ( $c=10$  mM)
- Mobilna faza (B): acetonitril
- Protok mobilne faze: 500  $\mu\text{L}/\text{min}$
- Temperatura kolone: 25  $^{\circ}\text{C}$
- Jonski izvor HESI: analiza pozitivnih jona
- Maseni analizator: kvadrupol
- Temperature kapilare: 280  $^{\circ}\text{C}$
- Napon kapilare: 5000V

### **Izvođenje analize:**

Merenje 8-oxodG u urinu vršeno je na Thermo ACCELA (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) HPLC-u povezanim sa masenim spektrofotometrom Thermo TSQ Quantum Access Max (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) koji se sastoji od tri kvadrupolna analizatora masa i koji je opremljen sa elektrosprej jonskim izvorom za zagrevanje (HESI). Svi analizirani urini, standardi i kontrole su snažno promešani, sonificirani 1 minut i potom centrifugirani 5 minuta na 10000 obt/min. Bistri supernatanti su zatim postavljeni u termostatirani "autosampler" HPLC-a na 4 °C i po 20 µL od svakog uzorka, standarda i kontrole je korišćeno za analizu. Uzorci su injektovani na Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ kolonu i eluirani mobilnom fazom (amonijum-acetat i acetonitril u zapreminskom odnosu 96,4:3,6) 10 minuta pri brzini od 500 µL/min, na temperaturi od 25°C. Zahvaljujući integrativnom preklopnom ventilu, koji je instaliran u maseni spektrometar, samo eluat frakcija 8-oxodG-a stiže do masenog spektrometra, dok se ostatak eluata isporučuje u otpad (0-5,5 minuta eluata ide u otpad, 5,5-7 minuta eluata ide do masenog spektrofotometra, 7-10 minuta eluata ide u otpad). Podaci o kalibraciji i uzorcima su dobijeni tehnikom višestrukog praćenja odabranih jona:  $[M+H]^+$  (prekursorski jon m/z 284; kolizioni produkt m/z 168). Kalibracija metode je vršena upotrebom standardnih rastvora različitih koncentracija 8-oxodG (c= 0; 7,5; 15,0; 30,00; 60,0; 120,0 nmol/L), pripremljenih u pool-u urina zdravih ispitanika. Limit detekcije (LOD) je iznosio 1,65 nmol/L i određen je merenjem 8-oxodG-a tri puta u kontrolnim vodenim rastvorima 8-oxodG-a poznate koncentracije. Limit kvantifikacije je ispitan u kontrolnim uzorcima 8-oxodG-a, pripremljenim u pool-u urina zdravih ispitanika i iznosio je 3,30 nmol/L. Tačnost, preciznost i ponovljivost su ispitani upotrebom kontrolnih uzoraka pripremljenim u pool-u urina i vodi, sa poznatim koncentracijama 8-oxodG (7,5; 15,0; 30,0; 60,0; 120,0 nmol/L). Preciznost je procenjena ponovljenim merenjem 8-oxodG-a u kontrolnim uzorcima, poznate koncentracije 8-oxodG-a, pripremljenim u urinu zdravih ispitanika. Tačnost je procenjena na osnovu odnosa izmerenih koncentracija 8-oxodG-a i očekivanih koncentracija, u kontrolnim uzorcima pripremljenih u pool-u urina, i iznosila je 97%. Ponovljivost je testirana upotrebom 15 nmol/L kontrolnog uzorka 8-oxodG-a. Nivo 8-oxodG u urinu je izražen kao indeks 8-oxodG/kreatinin kako

bi se omogućila normalizacija koncentracije 8-oxodG prema kreatininu. Hromatografski prikazi analize 8-oxodG-a su prikazani na Slici 9.



**Slika 9.** HPLC-MS/MS hromatogrami analize 8-oxodG ( $m/z$  284 $\rightarrow$ 168). **a.** 15 nmol/L 8-oxodG standard u vodi; **b.** čist urin; **c.** 15 nmol/L 8-oxodG standard u urinu.

### 3.6. Određivanje koncentracije kotinina u urinu

Za procenu stepena izloženosti duvanskom dimu, u urinima ispitanika određene su koncentracije kotinina. Urinarni kotinin je određivan metodom koju su opisali Rabba-Khabbaz i saradnici (70). Metoda se odlikuje visokom osetljivošću, jednostavnošću i brzinom izvođenja. Princip metode se zasniva na merenju koncentracije kotinina primenom tečne hromatografije visokih performansi (HPLC), nakon tečno-tečne ekstrakcije dihlormetanom u alkalnoj sredini.

#### Hemikalije i reagensi:

- Mobilne faze: acetonitril (ChromasoLV, HPLC grade,  $\geq 99\%$ ) i fosfatni pufer ( $c=30$  mmol/L,  $pH=4,5$ ).
- Voda (HPLC grade)
- Dihlormetan: sredstvo za ekstrakciju kotinina iz uzorka.
- Acetanilid: interni standard. Za analizu korišćen je rastvor acetanilida koncentracije 0,2 mg/ml. Ovaj rastvor je pripreman razblaživanjem osnovnog rastvora acetanilida ( $c=2,02$  mg/ml).
- Kotinin (Sigma-AldrichCo): standardni rastvori kotinina različitih koncentracija ( $c=10, 20, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 4000, 6000, 8000$  i  $10000$  ng/ml) su



korišćeni za kalibraciju metode. Standardni rastvori su pripremljeni, neposredno pre analize, u pool-u urina dodatkom odgovarajuće zapremine osnovnog rastvora kotinina ( $c=500 \mu\text{g/ml}$ ). Osnovni rastvor je stabilan 6 meseci na  $-20^\circ\text{C}$ .

- Natrijum-hidroksid ( $c=5 \text{ mol/L}$ ): obezbeđuje alkalnu sredinu.

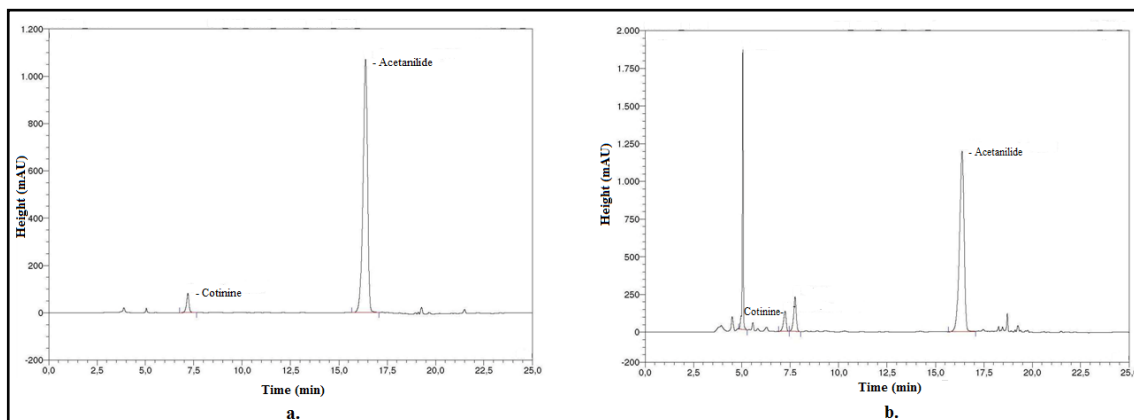
Kao kontrola, pripremani su uzorci u pool-u urina zdravih ispitanika, i u vodi, dodavanjem rastvora kotinina poznatih koncentracija.

#### **Izvođenje analize:**

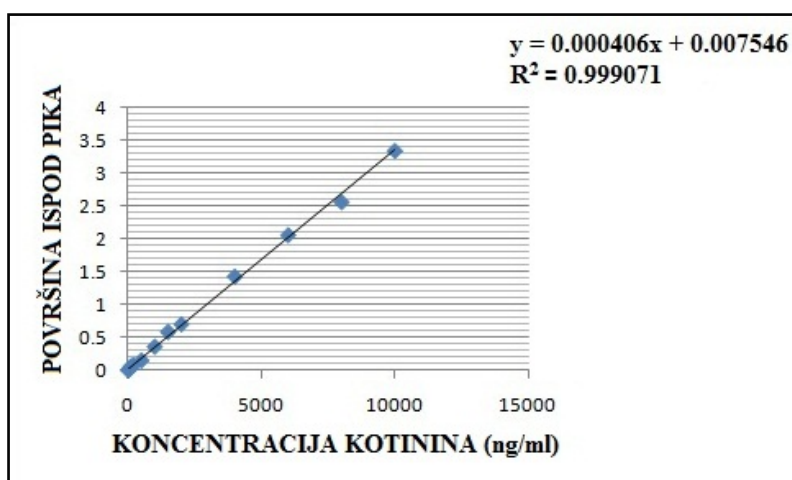
- Nakon otapanja i vorteksovanja uzoraka, po 1 ml svakog uzorka je preneto u epruvetu od 1,5 mL.
- U svaki uzorak dodato je 10  $\mu\text{L}$  rastvora acetanilida (interni standard,  $c=0,2 \text{ mg/ml}$ ) i smeša je kratko vorteksovana.
- Nakon toga, u svaki uzorak je dodato po 200  $\mu\text{L}$  rastvora natrijum-hidroksida ( $c=5 \text{ M}$ ), smeša kratko vorteksovana i centrifugirana na 13200 obr/min 5 minuta.
- Centrifugirani uzorci su odpipetirani, preneti u plastične epruvete i u svaki uzorak je dodato po 3 ml dihlormetana.
- Uzorci su vorteksovani 30 sekundi i potom mešani 20 minuta orbitalnom mešalicom, na hladnom.
- Nakon toga, uzorci su centrifugirani 5 minuta na 3000 br/min.
- Centrifugirani uzorci su alikvotirani. Sloj dihlormetana je prenet u dve epruvete po 1,5 mL i uparavan na vakuum uparivaču do suva (Eppendorf concentrator 5301 Complete system) (20 minuta na  $45^\circ\text{C}$ ).
- Upareni uzorci su rekonstruisani sa 100  $\mu\text{L}$  mobile faze (fosfatni pufer,  $c=30 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{pH}=4,5$ ), kratko vorteksovani i centrifugirani na 13200 obr/min 5 minuta.
- Centrifugirani uzorci su preneti u HPLC epruvete.

Urinarni kotinin je meren na instrumentu Ultimate 3000 (Termo Scientific) HPLC-u. Koncentracije kotinina u urinu su određene primenom internog standarda i metode standardne kalibracione krive. Kalibracija metode je vršena standardnim rastvorima kotinina u koncentracijama od 10-10000 ng/ml, pripremljenih u pool-u urina zdravih ispitanika. Nivo kotinina u urinu je izražen kao indeks kotinin/kreatinin kako bi se

omogućila normalizacija koncentracije kotinina prema kreatininu. Hromatografski prikazi analize kotinina su prikazani na Slici 10. Grafik standardne kalibracione krive za kotinin je prikazan na Slici 11.



**Slika 10.** HPLC hromatogrami analize kotinina. a. 500 ng/ml kotinin standard u vodi; b. 20 ng/ml kotinin standard u urinu.



**Slika 11.** Standardna kalibraciona kriva za kotinin u urinu

### **3.7. Metode za izolovanje genomske DNK**

#### **3.7.1. Izolovanje genomske DNK komercijalnim kitom**

Genomska DNK je izolovana iz nuklearnih ćelija periferne krvi korišćenjem komercijalnog kita GeneJET™ DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA), prema uputstvu proizvođača:

- U 200  $\mu$ L periferne venske krvi dodato je 20 $\mu$ L Proteinaze K i 400  $\mu$ L lizirajućeg pufera. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i inkubirana 10 minuta na 56°C.
- Smeši je dodato 200 $\mu$ L 96% etanola i ponovo je kratko vorteksovana.
- Pripremljeni lizat je nanet na prethodno sklopljenu kolonu (GeneJET™ DNA Purification Column) koja se nalazila u epruveti za sakupljanje. Kolona je centrifugirana 1 minut na 6000 obr/min i potom prenetu u novu epruvetu.
- Na kolonu je dodato 500 $\mu$ L pufera za ispiranje (Wash Buffer 1) i kolona je centrifugirana 1 minut na 8000 obr/min. Sakupljena tečnost iz epruvete je odbačena.
- Zatim, na kolonu je dodato 500 $\mu$ L pufera za ispiranje (Wash Buffer 2), koji je dodatno oslobodio DNK od nečistoća, i kolona centrifugira na 13000 obr/min u toku 3 minuta.
- Kolona je prebačena u epruvetu za eluciju DNK i dodato je 200 $\mu$ L sterilne vode. Kolona je inkubirana 1 minut na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirana na 8000 obr/min 1 minuta.
- Nakon centrifugiranja kolona je odbačena, a u epruveti je ostao rastvor DNK.

Izolovana DNK je čuvana na -20°C do daljeg korišćenja.

#### **3.7.2. Izolovanje genomske DNK pomoću CTAB metode**

Genomska DNK je izolovana iz nuklearnih ćelija periferne krvi pomoću cetil-trimetil-amonijum-bromida, takozvanom CTAB metodom (123). Princip metode zasniva se na oslobađanju DNK iz nuklearnih ćelija, dodatkom cetil-trimetil-amonijum-bromida (CTAB), nakon čega se oslobođena DNK ekstrahuje hloroformom.

Ekstrahirana DNK se precipitira dodatkom apsolutnog etanola i njeno prečišćavanje se vrši upotrebom 70% etanola.

CTAB protokol za izolaciju DNK:

- U 200  $\mu\text{L}$  periferne venske krvi dodato je 400  $\mu\text{L}$  rastvora litičkog pufera (8% CTAB, 1,2 M NaCl, 100 mM Tris i 50 mM EDTA) koji je prethodno zagrejan na 68 °C. Smeša je blago promešana nekoliko puta i inkubirana na 68 °C 15 minuta.
- Nakon toga, u smešu je dodato 600  $\mu\text{L}$  hloroforma, kratko promešana, i centrifugirana 10 minuta na 12000 obr/min.
- Gornja faza je pipetiranjem prenetu u novu epruvetu. Dodato je 5% CTAB (rastvoren u 1,2 M NaCl) do koncentracije od 0,1% CTAB i jednaka zapremina bidestilovane vode. Smeša je blago promešana i centrifugirana 10 minuta na 12000 obr/min.
- Nakon toga, supernatant je odliven i talog resuspendovan sa 300  $\mu\text{L}$  1,2M rastvora natrijum-hlorida. Resuspendovanom talogu je dodato 750  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola. Smeša je blago promešana i centrifugirana 5 minuta na 12000 obr/min.
- Supernatant je odliven i na talog je dodato 500  $\mu\text{L}$  70% etanola. Smeša je centrifugirana 5 minuta na 12000 obr/min.
- U krajnjem koraku, supernatant je odliven i talog osušen na vazduhu.
- Osušeni talog je resuspendovan sa 40  $\mu\text{L}$  bidestilovane vode.

Izolovana DNK čuvana je na -20°C do daljeg korišćenja.

### **3.8. Metode za detekciju genskih varijanti enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika**

U ovoj studiji korišćene su dve metode za detekciju genskih varijanti ispitivanih enzima: reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction) i metoda polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP). Sekvence prajmera (oligonukleotida) koji su u ovom radu korišćeni u reakcijama lančanog umnožavanja DNK (PCR), su prikazane u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Sekvence prajmera koje su korišćene u reakcijama lančanog umnožavanja DNK

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera	Literatura
CYP1A1F	5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3'	(124)
CYP1A1R	5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3'	
GSTM1F	5'-GAACTCCCTGAAAACCTAAAG-3'	(125)
GSTM1R	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	
GSTT1F	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'	
GSTT1R	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	
ALBF	5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3'	
ALBR	5'-GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC-3'	
GSTP1F	5'-GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG-3'	(103)
GSTP1R	5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3'	
EPO 1	5'-GATCGATAAGTTCCGTTTCACC-3'	(126)
EPO 2	5'-ATCCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT-3'	
EPO 3	5'-ACATCCACTTCATCCACGT-3'	
EPO 4	5'-ATGCCTCTGAGAAGCCAT-3'	

### 3.8.1. Detekcije genskih varijanti enzima GSTM1 i GSTT1 primenom metode reakcije lančanog umnožavanja DNK (PCR)

Osnovni princip reakcije lančanog umnožavanja je *in vitro* amplifikacija određenog segmenta DNK. Segment DNK koji se umnožava je definisan prajmerima koji su komplementarni njegovim krajevima i međusobno su suprotno orjentisani (127). Reakciona smeša, u kojoj se odvija sinteza određenog segmenta DNK sadrži: DNK matricu, prajmere (oligonukleotide),  $Mg^{2+}$  jone, dezoksiribonukleotidtrifosfate (dNTP), Taq polimerazu i pufer koji omogućava normalan rad Taq polimeraze. Metoda PCR se odvija u mikrotubama, kroz precizno kontrolisane ciklične promene temperature. Ovo za posledicu ima umnožavanje tačno određenog segmenta DNK, milion ili milijardu puta, nakon 30-45 odigranih ciklusa. Svaki ciklus u PCR procesu se sastoji od tri faze: denaturacija DNK matrice (dolazi do raskidanja vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK), hibridizacija (formiranje vodoničnih veza između matrice i prajmera) i elongacija prajmera (sinteza DNK - ugradnja nukleotida na 3' krajevima prajmera katalizovana Taq polimerazom). PCR je lančana reakcija zato što svaki

novosintetisani lanac DNK postaje matrica za sintezu novih DNK lanaca u narednom ciklusu.

U ovoj studiji, detekcija GSTM1 \*nulti i GSTT1 \*nulti varijanti je vršena multipleks PCR reakcijom, pri čemu se kao interna kontrola koristio albumin (125). Deo gena za albumin se takođe umnožavao u PCR reakciji. Dobijeni PCR fragmenti su detektovani na 2% agaroznom gelu pomoću etidijum-bromida i UV-svetla. Na agaroznom gelu, prisustvo GSTM1 gena je odgovaralo fragmentu 215 bp, GSTT1 gena fragmentu 480 bp i albumina fragmentu 350 bp. U slučaju delecije ovih gena, izostalo je umnožavanje u PCR reakciji i samim tim izostale su i trake na agaroznom gelu za GSTM1 i GSTT1 gene.

Sastav reakcione smeše za umnožavanje segmenata DNK u multipleks PCR reakciji, za genske varijante GSTM1 i GSTT1, prikazan je u Tabeli 5.

Prinosi PCR produkata su proveravani elektroforezom na 2% agaroznim gelovima.

**Tabela 5.** Sastav reakcione smeše za multipleks PCR reakciju, za genske varijante GSTM1 i GSTT1

Sastav reakcione smeše
1 µL rastvora DNK
10,45 µL sterilne vode
2 µL – 10 x Reakcioni pufer B (KapaBiosystem)
2 µL - 10 mM dNTP
2 µL – 25 mM MgCl <sub>2</sub>
0,4 µL - prajmera GSTT1F
0,4 µL - prajmera GSTT1R
0,4 µL - prajmera GSTM1F
0,4 µL - prajmera GSTM1R
0,4 µL - prajmera ALBF
0,4 µL - prajmera ALBR
0,15 µL - 5U/µL Taq (KAPA) polimeraze (KapaBiosystem)

Temperaturni uslovi multipleks PCR reakcije, za genske varijante GSTM1 i GSTT1, bili su sledeći:

94 °C /5min

(94 °C/1min, 58,3 °C/30 sec, 72 °C/45 sec) x 40 ciklusa

72 °C/7 min.

### 3.8.2. Detekcije genskih varijanti: CYP1A1, GSTP1, mEPHS i mEPHF gena primenom metode polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP)

Metoda polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP) predstavlja metodu koja omogućava direktnu detekciju genskih varijanti. Obradom PCR produkata restrikcionim enzimima dobijaju se DNK fragmenti različite dužine. U zavisnosti od toga da li je ispitivana promena prisutna ili odsutna u segmentu DNK zavisice i očuvanost mesta prepoznavanja restrikcione endonukleaze. Razdvajanjem produkata digestije na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu prisustvo genskih varijanti se detektuje prisustvom obrazac trake na gelu.

U ovoj studiji, PCR-RFLP metoda je korišćena za detekcije genskih varijanti: CYP1A1, GSTP1, mEPHS i mEPHF gena. Sastavi reakcionih smeša za umnožavanje segmenata DNK u PCR reakciji, za varijante CYP1A1, GSTP1, mEPHS i mEPHF gena, prikazani su u Tabeli 6a. Temperaturni uslovi PCR reakcije za ispitivane genske varijante su prikazani u Tabeli 6b.

Prinosi PCR produkata su proveravani elektroforezom na 2% agaroznim gelovima.

**Tabela 6a.** Sastavi reakcionih smeša za umnožavanje segmenata DNK u PCR reakciji

Genska varijanta	Dužina DNK segmenta	Sastav reakcione smeše
CYP1A1 (*1A/*2A)	339 bp	1 µL rastvora DNK
		15,3 µL sterilne vode
		2,5 µL - 10 x Reakcioni pufer B (KapaBiosystem)
		2,5 µL - 10 mM dNTP
		2,5 µL - 25 mM MgCl <sub>2</sub>
		0,5 µL - prajmera CYP1A1F
		0,5 µL - prajmera CYP1A1R
		0,2 µL - 5U/µL Taq (KAPA) polimeraze (KapaBiosystem)
GSTP1 (Ile105Val)	430 bp	1 µL rastvora DNK
		15,9 µL sterilne vode
		2,5 µL - 10 x Reakcioni pufer B (KapaBiosystem)
		2,5 µL - 10 mM dNTP
		2,5 µL - 25 mM MgCl <sub>2</sub>
		0,2 µL - prajmera GSTP1F
		0,2 µL - prajmera GSTP1R
		0,2 µL - 5U/µL Taq (KAPA) polimeraze (KapaBiosystem)

Nastavak Tabele 6a.

Genska varijanta	Dužina DNK segmenta	Sastav reakcione smeše
mEPHS (Tyr113His)	162 bp	1 µL rastvora DNK
		15,35 µL sterilne vode
		2,5 µL - 10 x Reakcioni pufer B (KapaBiosystem)
		2,5 µL - 10 mM dNTP
		2,5 µL - 25 mM MgCl <sub>2</sub>
		0,5 µL - prajmera EPO1
		0,5 µL - prajmera EPO2
		0,15 µL - 5U/µL Taq (KAPA) polimeraze (KapaBiosystem)
mEPHF (His139Arg)	210 bp	1 µL rastvora DNK
		15,3 µL sterilne vode
		2,5 µL - 10 x Reakcioni pufer B (KapaBiosystem)
		2,5 µL - 10 mM dNTP
		2,5 µL - 25 mM MgCl <sub>2</sub>
		0,5 µL - prajmera EPO3
		0,5 µL - prajmera EPO4
		0,2 µL - 5U/µL Taq (KAPA) polimeraze (KapaBiosystem)

CYP- eng.Cytochrome; GST-glutation-S-tranferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida.

**Tabela 6b.** Temperaturni uslovi PCR reakcije za analizirane genske varijante

Genska varijanta	Temperaturni uslovi PCR reakcije
CYP1A1 (*1A/*2A)	94 °C /5min (94 °C/45 sec, 60 °C/30 sec, 72 °C/30 sec) x 35 ciklusa 72 °C/7 min
GSTP1 (Ile105Val)	94 °C /5min (94 °C/30 sec, 57 °C/30 sec, 72 °C/30 sec) x 35 ciklusa 72 °C/7 min
mEPHS (Tyr113His)	94 °C /5min (94 °C/30 sec, 49,5 °C/1 min, 72 °C/30 sec) x 40 ciklusa 72 °C/7 min
mEPHF (His139Arg)	94 °C /5min (94 °C/30 sec, 55 °C/20 sec, 72 °C/20 sec) x 36 ciklusa 72 °C/7 min

CYP- eng.Cytochrome; GST-glutation-S-tranferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida.



Gen za CYP1A1 se nalazi na hromozomu 15q22-24. Genska varijanta T3801C (*MspI*) detektovana je PCR-RFLP metodom, na 3' flanking regionu gena (124). Detekcija je vršena nakon razdvajanja produkata digestije na poliakrilamidnom gelu, bojenjem srebro-nitratom. Alel 3801T je označen kao CYP1A1 \*1A a alel 3801C kao CYP1A1 \*2A. Na poliakrilamidnom gelu, prisustvo alela CYP1A1 \*1A je odgovaralo fragmentu od 339 bp a alela CYP1A1 \*2A fragmentima 205 i 134 bp.

Gen za GSTP1 se nalazi na hromozomu 11q13. U okviru ovog gena opisana je genska varijanta A313G koja dovodi do aminokiselinske zamene Ile→Val na poziciji 105. Detekcija je vršena PCR-RFLP metodom, a produkti digestije su analizirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, bojenjem srebro-nitratom (103). Na poliakrilamidnom gelu, prisustvo 105Ile alela je odgovaralo fragmentu od 329 bp dok je prisustvo 105Val alela odgovaralo fragmentima 222 bp i 107 bp.

Gen za mEPHX se nalazi na hromozomu 1q14.2.1. U kodirajućem regionu gena detektovane su dve genske varijante. Jedna dovodi do aminokiselinske zamene Tyr→His na poziciji 113 koja utiče na smanjenje aktivnosti („slow allele“ ili S alel), dok druga varijanta dovodi do zamene His→Arg na poziciji 139 koja utiče na povećanje aktivnosti („fast allele“ ili F alel). Detekcije S i F alela vršene su PCR-RFLP metodom, a produkti digestije su analizirani elektroforezom na 3% agaroznom gelu. Vizuelizacija produkata digestije omogućena je dodavanjem etidijum-bromida u gel i osvetljavanjem gela UV-svetlom (126). Za rezultate kod kojih je prinos PCR reakcije bio nedovoljan, analiza je vršena elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, bojenjem srebro-nitratom. Prisustvo 113Tyr je odgovaralo fragmentu od 142 bp, a S alel (113His) fragmentu od 162 bp na agaroznom gelu. Prisustvo 139His je odgovaralo fragmentu od 210 bp, dok se fragment od 164 bp uočavao kada je bio prisutan F alel (139 Arg).

### **3.9. Digestija produkata PCR reakcije**

Digestija DNK segmenata koji su dobijeni u PCR reakciji vršena je restrikcijom enzimima, prema uputstvima proizvođača. Digestija je vršena na temperaturi od 37 °C, preko noći. Sastavi smeša za digestiju, za varijante CYP1A1, GSTP1, mEPHS i mEPHF gena, prikazani su u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Sastavi smeša za digestiju DNK segmenata

Genska varijanta	Sastav smeše
CYP1A1 (*1A/*2A)	2 µL - 10 x Tango pufer (Fermentas) 0,3 µL - 10U/µL <i>MspI</i> (Fermentas) 17 µL PCR smeše 0,7 µL sterilne vode
GSTP1 (Ile105Val)	2 µL - 10 x Tango pufer (Fermentas) 0,2 µL - 10U/µL <i>BsmAI</i> (Fermentas) 17 µL PCR smeše 0,8 µL sterilne vode
mEPHS (Tyr113His)	2 µL - 10 x Pufer R (Fermentas) 0,2 µL - 10U/µL <i>EcoRV</i> (Fermentas) 17 µL PCR smeše 0,8 µL sterilne vode
mEPHF (His139Arg)	2,5 µL - 10 x Tango pufer (Fermentas) 0,5 µL - 10U/µL <i>RsaI</i> (Fermentas) 17 µL PCR smeše 5 µL sterilne vode

CYP-eng. Cytochrome; GST- glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida.

### 3.10. Provera prinosa/kvaliteta izolovane DNK i provera uspešnosti amplifikacije DNK primenom elektroforeze u agaroznom gelu

Elektroforeza na agaroznom gelu predstavlja najčešće korišćen metod za detekciju i analizu nukleinskih kiselina (128).

#### Priprema agaroznog gela:

- U 100 ml TAE pufera (40mM Tris, 20mM natrijum-acetat, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA) dodata je određena količina agaroze (1% gel - 1 g agaroze; 2% gel - 2g agaroze) i smeša je zagrejana do ključanja.
- Nakon toga, rastvor agaroze je ohlađen do 50 °C i dodat je etidijum-bromid u koncentraciji od 1 µg/mL.
- Rastvor agaroze je izliven u kalup, u koji su prethodno stavljeni odgovarajući češljevi. Gel je ostavljen da želatinira 30 minuta.
- Nakon želatiniranja, češljevi su izvađeni, kalup je prenet u kadicu i doliven je TAE pufer 0,5 cm iznad površine gela.

- Na ovako pripremljen gel naneti su DNK markeri i uzorci za analizu.

Elektroforeza je tekla u TAE puferu, pri naponu od 7-10V/cm. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćen je odgovarajući komercijalni DNK marker (100 bp DNA Ladder, O'GeneRuler, Thermo Fisher Scientific). Vizuelizacija DNK je omogućena dodavanjem etidijum-bromida u gel i osvetljavanjem gela UV svetlošću pri čemu dolazi do fluorescencije. Intenzitet fluorescencije je proporcionalan količini DNK u datoj traci na gelu. DNK je vizuelizovana pomoću transluminatora i gel dokumentovan putem CCD kamere sa BioDocAnalyze sistemom.

Prinos i kvalitet izolovane DNK je proveren elektroforezom u 1% agaroznom gelu, dok je provera uspešnosti amplifikacije fragmenata dobijenih PCR metodom vršena u 2% agaroznom gelu. Detekcije genskih varijanti GSTT1 i GSTM1 su vršene na 2%, a varijante mEPH (Tyr113His) i mEPH (His139Arg) gena na 3% agaroznom gelu.

### **3.11. Elektroforeza DNK u nativnom gelu od poliakrilamida**

Osim elektroforeze u agaroznom gelu, elektroforeza na poliakrilamidnom gelu se takođe koristi za detekciju i analizu nukleinskih kiselina (128). U ovoj studiji, elektroforeza u 10% nenedenaturišućem poliakrilamidnom gelu je korišćena za detekciju CYP1A1 \*1A/\*2A i GSTP1 (Ile150Val) genskih varijanti.

#### **Priprema poliakrilamidnog gela:**

- U zavisnosti od koncentracije i željene debljine gela, pomešane su određene količine akrilamida (akrilamid i N,N'-metilenbisakrilamid u odnosu 29:1), 0,1% APS-a (amonijum-persulfat), 1 µL/ml TEMED-a (tetrametil-etilendiamin) i Tris-boratni (TBE) pufera (100mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8).
- Smeša je izlivena u kalup, u koji su prethodno stavljeni odgovarajući češljevi. Gel je ostavljen da polimerizuje.
- Nakon polimerizacije, češljevi su izvađeni, kalup je prenet u kadicu za vertikalnu elektroforezu u koju je naliven TBE pufer (100mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8).
- Na ovako pripremljen gel naneti su DNK markeri i uzorci za analizu.

Elektroforeza je tekla u TBE puferu (100mM Tris, 83 mM borna kiselina, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8) pri naponu od 10V/cm. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćen je odgovarajući komercijalni DNK marker (100 bp DNA Ladder, O'GeneRuler, Thermo Fisher Scientific). Nakon elektroforeze, vizuelizacija je vršena bojenjem gelova srebro-nitratom.

Poliakrilamidni gelovi se po završenoj elektroforezi fiksiraju 20 minuta u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline (129). Gelovi se boje 10 minuta u 0,1% rastvoru srebro-nitrata, a potom dva puta isperu destilovanom vodom radi uklanjanja viška rastvora srebro-nitrata. Razvijanje se vrši 20 minuta u rastvoru 1,5% natrijum-hidroksida, 0,01% natrijum-borhidrida i 0,048% formaldehida (pre sipanja razvijaača, gel se ispere sa malom količinom razvijaača kako bi se uklonio višak srebra). Fiksiranje obojene DNK u gelu se vrši 10 minuta u rastvoru 0,75% natrijum-bikarbonata.

### 3.12. Statistička analiza

Dobijeni rezultati su analizirani odgovarajućim statističkim metodama uz pomoć statističkog programa SPSS (verzija 17), a vrednost za verovatnoću  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom. Tip raspodele kontinuiranih promenljivih je ispitan primenom Kolmogorov-Smirnov-og testa (K-S test). Ukoliko je raspodela bila normalna, kontinuirane promenjive su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Ako je raspodela podataka imala normalnu distribuciju nakon logaritmovanja vrednosti, tada su rezultati prikazani kao medijana sa rasponom 5-95% percentil. Kategorijske promenljive su predstavljene kao apsolutne i relativne frekvencije. Za parametre čija je raspodela bila normalna primenjeni su parametarski testovi poređenja srednjih vrednosti između dve grupe nezavisnih podataka (Studentov t-test), kao i parametarske metode poređenja srednjih vrednosti između tri i više grupa nezavisnih podataka (analiza varijanse, ANOVA, jednofaktorska, dvofaktorska i trofaktorska ANOVA). Ako je primenom testa jednofaktorska ANOVA dobijena statistički značajna razlika između grupa, dalje je ispitivano između kojih grupa podataka je prisutna razlika primenom LSD *post hoc* testa (Least Significant Difference, LSD), a kod primene dvo- ili trofaktorske ANOVE, primenjen je Šidakov *post hoc* test. Za parametre čija je raspodela odstupala od normalne, primenjeni su neparametarski testovi poređenja srednjih

vrednosti između dve ili više grupa nezavisnih podataka (Mann-Whitney i Kruskal-Wallis test). Za poređenje kategorijskih promenljivih između različitih grupa korišćen je  $\chi^2$ -test. Odstupanje distribucije genotipova od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže procenjeno je  $\chi^2$ -testom ili Fisher egzaktnim testom (ukoliko je broj slučajeva  $<5$ ). Za ispitivanje postojanja veze između promenljivih korišćena je parametarska Pearson-ova korelaciona analiza ili neparametarska Spearman-ova korelaciona analiza. Binarna logistička regresija (enter metoda) je korišćena za procenu uticaja genetskih i ne-genetskih faktora rizika na verovatnoću nastanka i razvoja HOBP-a. Za procenu dijagnostičkih karakteristika i graničnih vrednosti parametara oksidativnog stresa u otkrivanju HOBP korišćena je ROC kriva (Receiver Operating Characteristics).

## **4. REZULTATI**

U prvom delu studije ispitan je uticaj oksidativnog stresa i izloženosti duvanskom dimu na nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP), dok su u drugom delu ispitan genetski i ne-genetski faktori rizika za nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP).

### **4.1. Uticaj oksidativnog stresa i izloženosti duvanskom dimu u nastanku i razvoju hronične opstruktivne bolesti pluća**

#### **4.1.1. Karakteristike ispitanika**

Ovo ispitivanje uključilo je 124 pacijenta (73 muškarca i 51-u ženu, starosne dobi  $64,88 \pm 8,10$  godina) obolelih od hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP). Kontrolnu grupu je činilo 173 ispitanika (107 muškaraca i 66 žena, starosne dobi  $52,27 \pm 14,98$  godina) kod kojih je isključeno prisustvo HOBP.

Za procenu stepena izloženosti nikotinu iz duvanskog dima, u urinu svih ispitanika meren je kotinin i izražen je kao indeks kotinin/kreatinin. Za procenu red-oks statusa u serumu svih ispitanika mereni su: ukupni oksidativni status (TOS) i ukupni antioksidativni kapacitet (TAC). Oksidativni indeks (OSI) je predstavljen kao odnos ukupnog oksidativnog statusa i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TOS/TAC). Za svakog ispitanika su prikupljeni podaci o pušačkom statusu i na osnovu njih ispitanici su podeljeni u dve grupe, pušači i nepušači. Rezultati deskriptivne analize osnovnih kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika kod obolelih od HOBP i kontrolnih ispitanika prikazane su u Tabeli 8.

Poređenjem osnovnih karakteristika i kliničkih parametara između grupe pacijenata i kontrolne grupe, uočeno je da su pacijenti činili stariju populaciju sa nižim vrednostima indeksa telesne mase ( $p < 0,001$ ). Viši nivo oksidativnog stresa je primećen kod pacijenata (povišene vrednosti ukupnog oksidativnog statusa i oksidativnog indeksa) u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,001$ ), kako u celokupnoj grupi ispitanika, tako i u grupama koje su bile podeljenje prema polu.

**Tabela 8.** Kvalitativne i kvantitativne karakteristike u svih zdravih ispitanika i HOBP-pacijenata kao i u grupama podjeljenih prema polu

Karakteristike i biomarkeri	Svi		Muškarci		Žene	
	Kontrola (n=173)	HOBP (n=124)	Kontrola (n=107)	HOBP (n=73)	Kontrola (n=66)	HOBP (n=51)
Starost, godine	52,27±14,98 <sup>a</sup>	64,88±8,10	45,65±13,43 <sup>b,e</sup>	65,21±8,16	63,26±10,22	64,41±8,09
Pušački status, pušači (%)	29,50	36,30	31,70	38,40	23,80	33,30
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,20±4,06 <sup>a</sup>	23,84±5,16	27,31±3,97 <sup>b</sup>	23,84±4,95	25,70±5,74	23,84±5,88
Urinarni kotinin/kreatinin (mg/mmol)	0,21±0,16	0,23±0,25	0,20±0,15	0,21±0,21	0,23±0,16	0,26±0,31
TOS (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv./L)	0,03±0,01 <sup>a</sup>	0,11±0,07	0,03±0,01 <sup>b,e</sup>	0,10±0,07	0,02±0,01 <sup>c</sup>	0,11±0,07
TAC (mmol Trolox Equiv./L)	2,74±0,22	2,80±0,32	2,79±0,21 <sup>c</sup>	2,86±0,30 <sup>d</sup>	2,66±0,22	2,73±0,33
OSI (TOS/TAC)	0,01±0,01 <sup>a</sup>	0,04±0,03	0,01±0,01 <sup>b</sup>	0,04±0,03	0,01±0,004 <sup>c</sup>	0,04±0,03
FEV1, %	-	36,16±17,29	-	35,84±17,99	-	36,58±16,49
FVC, %	-	53,85±20,61	-	54,21±19,66	-	53,38±22,04
FEV1/FVC indeks	-	53,17±16,31	-	50,01±13,55	-	57,40±18,73

Kontinuirane promjenjive su prikazane kao srednja vrednost±standardna devijacija; HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; BMI-indeks telesne mase; FEV1%-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); FVC%-forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti); TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks. <sup>a</sup> razlike između kontrole i HOBP u čitavoj populaciji; <sup>b</sup> razlike između kontrole i HOBP u populaciji muškaraca; <sup>c</sup> razlike između kontrole i HOBP u populaciji žena; <sup>d</sup> razlike između muškaraca i žena u HOBP populaciji; <sup>e</sup> razlike između muškaraca i žena u kontrolnoj populaciji; p-statistička značajnost (p<0,05).

#### 4.1.2. Korelacije između parametara oksidativnog stresa, kotinina, indeksa telesne mase i godina starosti u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP

Primenom Pearsonove korelacije identifikovali smo statistički značajne korelacije između parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, indeksa telesne mase i godina u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata (Tabela 9.). Dobijena je statistički značajna i veoma visoka pozitivna korelacija između ukupnog oksidativnog statusa (TOS) i oksidativnog indeksa (OSI), kod obe grupe ispitanika ( $p < 0,001$ ; Pearsonov  $r > 0,9$ ). Kod pacijenata, pozitivne korelacije su dobijene između ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) i starosti ( $p = 0,045$ ) kao i između starosti i indeksa telesne mase (BMI) ( $p = 0,026$ ). U kontrolnoj grupi, pozitivna korelacija je dobijena između ukupnog oksidativnog statusa (TOS) i antioksidativnog kapaciteta (TAC) ( $p = 0,003$ ), kao i između ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) i indeksa telesne mase (BMI) ( $p = 0,008$ ). U istoj grupi, dobijena je negativna korelacija između starosti i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) ( $p = 0,019$ ), ukupnog oksidativnog statusa (TOS) ( $p < 0,001$ ) i oksidativnog indeksa (OSI) ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 9.** Korelacije između kvantitativnih karakteristika u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata

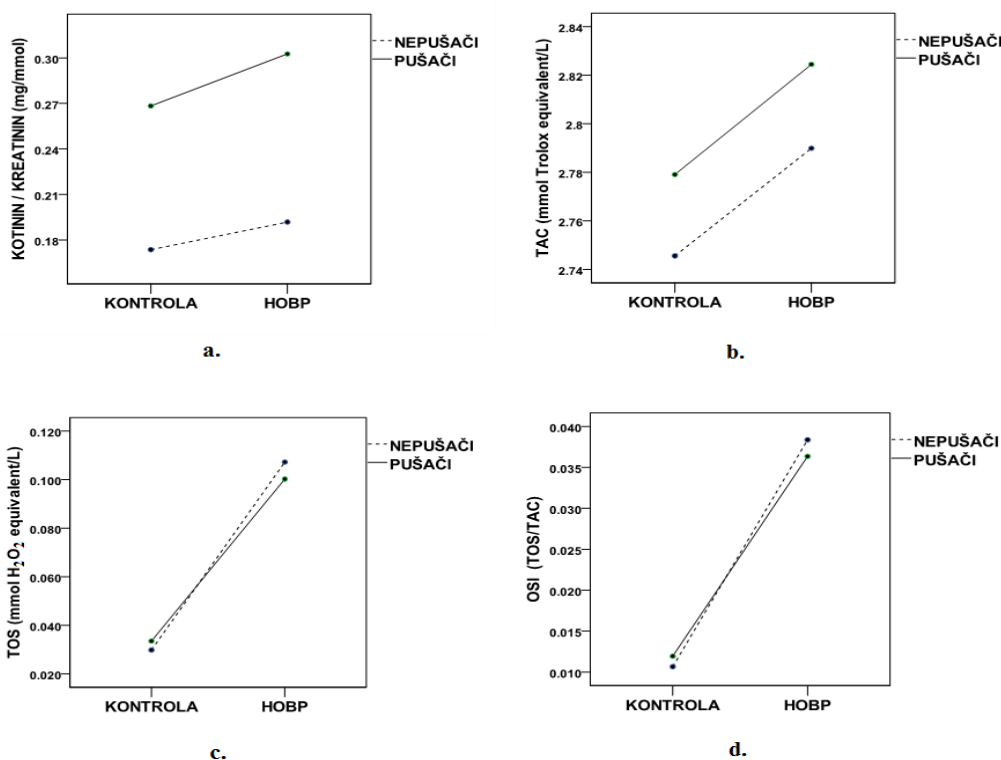
Parametri	Kontrola (n=173)	HOBP-pacijenti (n=124)
	r (p)	r (p)
Kotinin/kreatinin i TAC	0,062 (0,464)	0,037 (0,688)
Kotinin/kreatinin i TOS	0,157 (0,060)	-0,021 (0,821)
Kotinin/kreatinin i OSI	0,126 (0,134)	-0,040 (0,660)
Kotinin/kreatinin i godine	0,013 (0,879)	-0,116 (0,203)
Kotinin/kreatinin i BMI	-0,145 (0,179)	-0,157 (0,399)
TAC i TOS	<b>0,223 (0,003)</b>	0,076 (0,405)
TAC i OSI	0,046 (0,548)	-0,091 (0,314)
TAC i godine	<b>-0,179 (0,019)</b>	<b>0,181 (0,045)</b>
TAC i BMI	<b>0,282 (0,008)</b>	-0,088 (0,632)
TOS i OSI	<b>0,958 (0,000)</b>	<b>0,980 (0,000)</b>
TOS i godine	<b>-0,395 (0,000)</b>	-0,120 (0,183)
TOS i BMI	0,091 (0,401)	0,028 (0,879)
OSI i godine	<b>-0,368 (0,000)</b>	-0,152 (0,092)
OSI i BMI	-0,017 (0,873)	0,043 (0,817)
Godine i BMI	0,148 (0,167)	<b>0,393 (0,026)</b>

Podaci su predstavljeni kao: Pearsonov koeficijent korelacije r (statistička značajnost p). HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks; BMI indeks telesne mase; r-Pearsonov koeficijent korelacije; p-statistička značajnost ( $p < 0,05$ ).



### 4.1.3. Analiza uticaja pušačkog statusa na nivoe kotinina, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP

Smatra se da većina slučajeva HOBP nastaje kao rezultat izloženosti štetnim inhalacionim česticama i gasovima, među kojima je duvanski dim najrasprostranjeniji aerozagadivač. U ovoj studiji ispitan je uticaj pušenja na nivoe kotinina/kreatinina, oksidativnog stresa (procenjen na osnovu nivoa ukupnog oksidativnog statusa TOS i oksidativnog indeksa OSI) i antioksidativne zaštite (procenjena na osnovu ukupnog antioksidativnog kapaciteta TAC), kod kontrolnih ispitanika i pacijenata obolelih od HOBP (Slika 12. i Tabela 10.). Kod svih ispitanika izmereni su nivoi kotinina u urinu (izražen kao odnos kotinin/kreatinin), dok su u serumima izmereni ukupni oksidativni status (TOS) i ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) i izračunat je oksidativni indeks (OSI).



**Slika 12.** Aritmetičke srednje vrednosti kotinina i parametara oksidativnog stresa u grupi HOBP pacijenata (n=124) i kontrolnoj grupi (n=173) prikazane prema statusu pušenja; **a.** kotinin/kreatinin (mg/mmol); **b.** ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) (mmol Trolox equivalent/L); **c.** ukupni oksidativni status (TOS) (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent/L); **d.** oksidativni indeks (OSI).

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća.

**Tabela 10.** Testiranje uticaja, veličine uticaja individualnih faktora (zdravstveno stanje i pušački status) i njihovih interakcija na nivoe kotinina, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
Kotinin/ kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	0,309	0,004
	Pušenje (pušači/nepušači)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,057</b>
	Stanje*pušenje	0,754	<0,001
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Pušenje: kontrola	<b>0,009</b>	<b>0,026</b>
	Pušenje: HOPB	<b>0,003</b>	<b>0,033</b>
	Kontrola i HOBP: pušači	0,415	0,003
	Kontrola i HOBP: nepušači	0,541	0,001
TAC	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	0,195	0,006
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,325	0,004
	Stanje*pušenje	0,988	<0,001
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Pušenje: kontrola	0,487	0,002
	Pušenje: HOPB	0,485	0,002
	Kontrola i HOBP: pušači	0,422	0,002
	Kontrola i HOBP: nepušači	0,266	0,005
TOS	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,336</b>
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,791	<0,001
	Stanje*pušenje	0,393	0,003
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Pušenje: kontrola	0,672	0,001
	Pušenje: HOPB	0,434	0,002
	Kontrola i HOBP: pušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,140</b>
	Kontrola i HOBP: nepušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,306</b>
OSI	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,326</b>
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,874	<0,001
	Stanje*pušenje	0,477	0,002
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Pušenje: kontrola	0,692	0,001
	Pušenje: HOPB	0,543	0,001
	Kontrola i HOBP: pušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,137</b>
	Kontrola i HOBP: nepušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,292</b>

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks; p-statistička značajnost ( $p < 0,05$ ).

Primenom testa, dvo-faktorska ANOVA (two-way ANOVA), utvrđeno je da na nivo urinarnog kotinina utiče samo pušenje ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,057); nije bilo razlike u nivou kotinina između zdravih i HOBP-pacijenata ( $p = 0,309$ ; eta kvadrat=0,004), kao ni između grupa koje su podeljene prema pušačkom statusu i

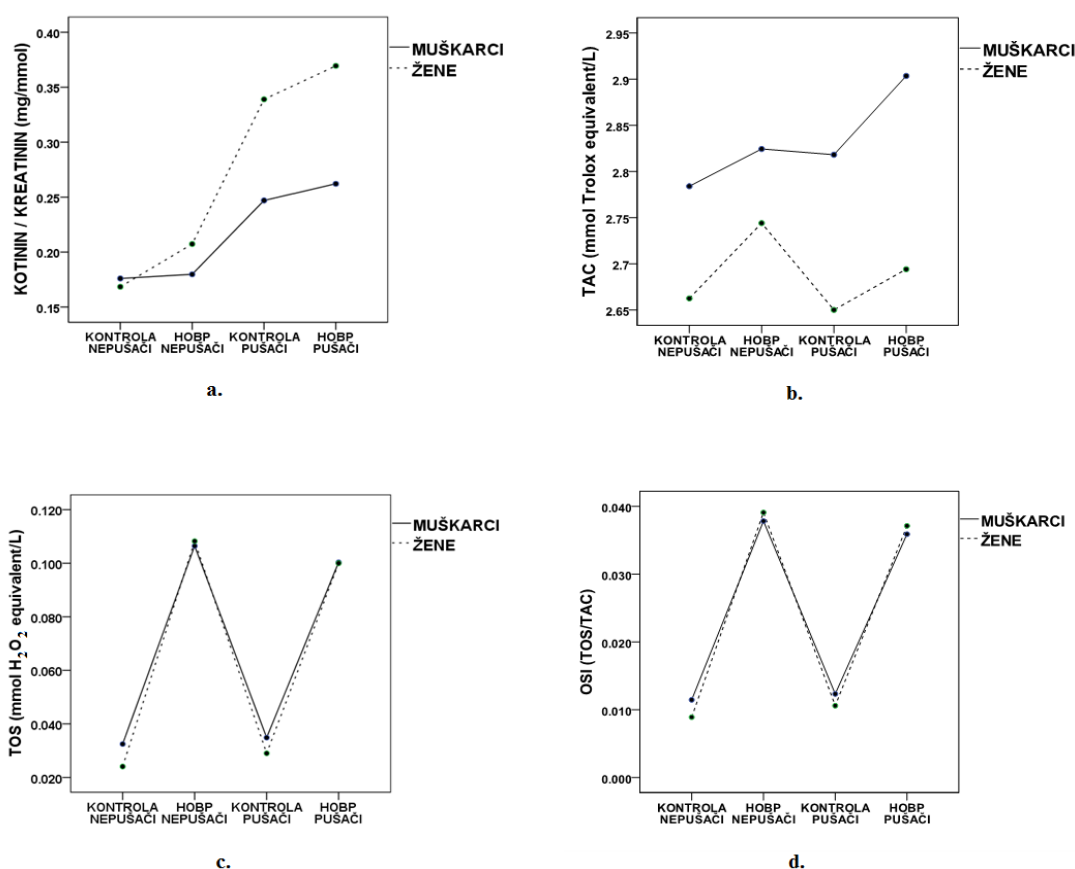
prisustvu same bolesti ( $p=0,754$ ; eta kvadrat $<0,001$ ) (Tabela 10.). Daljom analizom, uz pomoć Šidak testa, utvrđeno je da se nivo kotinina razlikuje samo u zavisnosti od pušačkog statusa u obe ispitivane grupe. Pušači su imali značajno viši nivo kotinina i u kontrolnoj grupi ( $p=0,009$ ; eta kvadrat $=0,026$ ) i u grupi HOBP-pacijenata ( $p=0,003$ ; eta kvadrat $=0,033$ ) (Slika 12a.). Vrednosti statističkog parametra, eta kvadrata, ukazuju da iako je ustanovljen uticaj pušenja na nivo kotinina u urinu, ovaj uticaj je bio mali, kako u kontrolnoj grupi (2,6%), tako i u grupi HOBP-pacijenata (3,3%). Nivo kotinina se nije razlikovao između kontrolne grupe i grupe pacijenata, bez obzira na pušački status (pušači:  $p=0,415$ ; eta kvadrat $=0,003$ ; nepušači:  $p=0,541$ ; eta kvadrat $=0,001$ ).

Statističkom analizom je pokazano da se nivo antioksidativne zaštite (TAC) nije razlikovao u odnosu na prisustvo bolesti ( $p=0,195$ ; eta kvadrat $=0,006$ ), ni u odnosu na pušački status ( $p=0,325$ ; eta kvadrat $=0,004$ ), kao ni između grupa koje su podeljene u odnosu na pušački status i prisustvo same bolesti ( $p=0,988$ ; eta kvadrat $<0,001$ ) (Tabela 10.). Primenom Šidak testa, pokazano je da se nivo ukupnog antioksidativnog kapaciteta nije razlikovao između pušača i nepušača, u obe ispitivane grupe (kontrola:  $p=0,487$ ; eta kvadrat $=0,002$ ; pacijenti sa HOBP:  $p=0,485$ ; eta kvadrat $=0,002$ ). Takođe, nisu primećene razlike u nivoima TAC između kontrolne i grupe pacijenata, bez obzira na pušački status (pušači:  $p=0,422$ ; eta kvadrat $=0,002$ ; nepušači:  $p=0,266$ ; eta kvadrat $=0,005$ ) (Slika 12b.).

Dvo-faktorskom ANOVA metodom je utvrđeno da se nivo oksidativnog stresa (procenjen na osnovu ukupnog oksidativnog statusa TOS i oksidativnog indeksa OSI) razlikuje samo u odnosu na prisustvo bolesti (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat $=0,336$ ; OSI:  $p<0,001$ ; eta kvadrat $=0,326$ ), dok pušenje nije imalo uticaja (TOS:  $p=0,791$ ; eta kvadrat $<0,001$ ; OSI:  $p=0,874$ ; eta kvadrat $<0,001$ ), kao ni interakcija između pušačkog statusa i prisustva same bolesti (TOS:  $p=0,393$ ; eta kvadrat $=0,003$ ; OSI:  $p=0,477$ ; eta kvadrat $=0,002$ ) (Tabela 10.). Daljom analizom, primenom Šidak testa utvrđeno je da su pacijenti imali viši nivo oksidativnog stresa, u obe grupe, u grupi pušača (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat $=0,140$ ; OSI:  $p<0,001$ ; eta kvadrat $=0,137$ ) i grupi nepušača (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat $=0,306$ ; OSI:  $p<0,001$ ; eta kvadrat $=0,292$ ). Nivo oksidativnog stresa se nije razlikovao između pušača i nepušača, u obe ispitivane grupe (TOS: kontrola:  $p=0,672$ ; eta kvadrat $=0,001$ ; pacijenti sa HOBP:  $p=0,434$ ; eta kvadrat $=0,002$ ; OSI: kontrola:  $p=0,692$ ; eta kvadrat $=0,001$ ; pacijenti sa HOBP:  $p=0,543$ ; eta kvadrat $=0,001$ ) (Slika 12c. i Slika 12d.).

#### 4.1.4. Analiza uticaja pola i pušačkog statusa na nivoe kotinina, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP

Primenom testa tro-faktorska ANOVA (three-way ANOVA) analiziran je uticaj pola i pušačkih navika na nivoe kotinina u urinu, oksidativnog stresa (TOS i OSI) i antioksidativne zaštite (TAC), u kontrolnoj grupi i grupi pacijenta obolelih od HOBP, koji su podeljeni prema pušačkom statusu (Slika 13. i Tabela 11.).



**Slika 13.** Aritmetičke srednje vrednosti kotinina i parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite u grupi HOBP-pacijenata podeljenoj prema pušačkom statusu (HOBP-nepušači, n=79 i HOBP-pušači, n=45) i kontrolnoj grupi podeljenoj prema pušačkom statusu (kontrola-nepušači, n=122 i kontrola-pušači, n=51), prikazane prema polu; **a.** kotinin/kreatinin (mg/mmol); **b.** ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) (mmol Trolox equivalent/L); **c.** ukupni oksidativni status (TOS) (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent/L); **d.** oksidativni indeks (OSI).

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća.

**Tabela 11.** Testiranje uticaja individualnih faktora (zdravstveno stanje, pol i pušački status) i njihovih interakcija na nivoe kotinina, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
Kotinin/ kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	0,430	0,002
	Pol (muškarci/žene)	<b>0,051</b>	0,015
	Pušenje (pušači/nepušači)	<b>&lt;0,001</b>	0,068
	Stanje*pol	0,652	0,001
	Stanje*pušenje	0,979	<0,001
	Pol*pušenje	0,110	0,01
	Stanje*pol*pušenje	0,859	<0,001
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Pušenje: kontrola-žene	<b>0,017</b>	<b>0,022</b>
	Pušenje: kontrola-muškarci	0,089	0,011
	Pušenje: HOPB-žene	<b>0,006</b>	<b>0,029</b>
	Pušenje: HOPB-muškarci	0,084	0,011
TAC	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	0,088	0,011
	Pol (muškarci/žene)	<b>&lt;0,001</b>	0,057
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,730	<0,001
	Stanje*pol	1,00	<0,001
	Stanje*pušenje	0,959	<0,001
	Pol*pušenje	0,232	0,005
	Stanje*pol*pušenje	0,574	0,011
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Pol: nepušači-kontrola	<b>0,029</b>	<b>0,018</b>
	Pol: pušači-kontrola	0,073	0,012
	Pol: nepušači-HOPB	0,173	0,007
	Pol: pušači-HOPB	<b>0,009</b>	<b>0,026</b>
TOS	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<b>&lt;0,001</b>	0,309
	Pol (muškarci/žene)	0,639	0,001
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,798	<0,001
	Stanje*pol	0,566	0,001
	Stanje*pušenje	0,429	0,002
	Pol*pušenje	0,988	<0,001
	Stanje*pol*pušenje	0,863	<0,001
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje: nepušači-muškarci	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,199</b>
	Stanje: pušači-muškarci	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,098</b>
	Stanje: nepušači-žene	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,163</b>
	Stanje: pušači-žene	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,050</b>

Nastavak Tabele 11.

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
OSI	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,300</b>
	Pol (muškarci/žene)	0,859	<0,001
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,895	<0,001
	Stanje*pol	0,503	0,002
	Stanje*pušenje	0,523	0,002
	Pol*pušenje	0,938	<0,001
	Stanje*pol*pušenje	0,932	<0,001
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje: nepušači-muškarci	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,187</b>
	Stanje: pušači-muškarci	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,093</b>
	Stanje: nepušači-žene	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,154</b>
	Stanje: pušači-žene	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,051</b>

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks; p-statistička značajnost ( $p < 0,05$ ).

Primenom testa, tro-faktorska ANOVA (three-way ANOVA), utvrđeno je da se nivo kotinina u urinu razlikuje prema polu ( $p=0,051$ ; eta kvadrat=0,015) i pušačkom statusu ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,068); nivo kotinina se nije razlikovao između zdravih i HOBP-pacijenata ( $p=0,430$ ; eta kvadrat=0,002), kao ni između grupa podeljenih prema ovim nezavisnim faktorima (Tabela 11.). Daljom analizom, uz pomoć Šidak testa analizirana je razlika u nivou kotinina između grupa koje su se razlikovale prema polu, pušačkom statusu i prema zdravstvenom stanju. Utvrđeno je da se nivo kotinina razlikuje samo kod žena u zavisnosti od pušačkog statusa u obe ispitivane grupe. Žene-pušači su imale značajno viši nivo kotinina i u kontrolnoj grupi ( $p=0,017$ ; eta kvadrat=0,022) i u grupi HOBP pacijenata ( $p=0,006$ ; eta kvadrat=0,029) (Slika 13a.). Ovaj uticaj pušenja na nivo kotinina je bio relativno mali u obe ispitivane grupe (u kontroli 2,2% i kod HOBP pacijenata 2,9%). U populaciji muškaraca, nivo kotinina se nije značajno razlikovao u odnosu na pušački status, kako u kontrolnoj grupi ( $p=0,089$ ; eta kvadrat=0,011), tako i u grupi pacijenata sa HOBP ( $p=0,084$ ; eta kvadrat=0,011), ali je nivo verovatnoće bio na granici značajnosti u obe grupe ispitanika.

Tro-faktorskom ANOVA metodom je utvrđeno da na nivo antioksidativne zaštite utiče samo pol ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,057), dok prisustvo bolesti ( $p=0,088$ ; eta kvadrat=0,011), pušenje ( $p=0,730$ ; eta kvadrat<0,001) i interakcije ovih nezavisnih

faktora nemaju statistički značajan uticaj (Tabela 11.). Korišćenjem Šidak testa, ispitan je uticaj pola u grupama koje su se razlikovale prema zdravstvenom stanju i pušačkom statusu. Muškarci su imali značajno više nivoe antioksidativne zaštite u grupi zdravih nepušača ( $p=0,029$ ; eta kvadrat= $0,018$ ), kao i u grupi pacijenata pušača ( $p=0,009$ ; eta kvadrat= $0,026$ ) (Slika 13b.). Uticaj pola, iako statistički značajan, bio je relativno mali u obe ispitivane grupe (u grupi kontrolnih nepušača 1,8% i kod pacijenata pušača 2,6%). Uticaj pola na nivo antioksidativne zaštite nije bio značajan u grupi pacijenata nepušača ( $p=0,173$ ; eta kvadrat= $0,007$ ), kao i u grupi kontrolnih pušača ( $p=0,073$ ; eta kvadrat= $0,012$ ).

Primenom tro-faktorskog ANOVA testa, utvrđeno je da na nivo oksidativnog stresa utiče samo prisustvo bolesti (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,309$ ; OSI: ( $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,300$ ), dok pol (TOS:  $p=0,639$ ; eta kvadrat= $0,001$ ; OSI:  $p=0,859$ ; eta kvadrat= $0,001$ ), pušenje (TOS:  $p=0,798$ ; eta kvadrat= $0,001$ ; OSI: ( $p=0,503$ ; eta kvadrat= $0,002$ ) i interakcije ovih nezavisnih faktora nemaju statistički značajan uticaj (Tabela 11.). Daljom analizom, uz pomoć Šidak testa analiziran je uticaj prisustva bolesti u grupama ispitanika koje su se razlikovale prema polu i pušačkom statusu. U populaciji žena, pacijentkinje su imale više nivoe oksidativnog stresa i u grupi pušača (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,050$ ; OSI:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,051$ ) i u grupi nepušača (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,163$ ; OSI:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,154$ ). Takođe, u populaciji muškaraca, pacijenti su imali više nivoe oksidativnog stresa u obe ispitivane grupe, pušači (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,098$ ; OSI:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,093$ ) i nepušači (TOS:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,199$ ; OSI:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,187$ ) (Slika 13c. i Slika 13d.)

#### **4.1.5. Analiza ROC krivih (Receiving Operating Characteristic Curves) za parametre izloženosti duvanskom dimu, antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa**

Da bi se proverila dijagnostička tačnost upotrebe parametara izloženosti duvanskom dimu, antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa u razlikovanju pacijenata sa HOBP od zdravih ispitanika, urađena je analiza ROC krivih. Površina ispod krive (AUC) bila je mera tačnosti ispitivanih parametara u identifikovanju pacijenata sa HOBP.

Primenom Hosmer-Lemeshow pravila, potencijal samih parametara je definisan kao slab ( $0,5 \leq AUC < 0,7$ ), prihvatljiv ( $0,7 \leq AUC < 0,8$ ), odličan ( $0,8 \leq AUC < 0,9$ ) i izvanredan ( $AUC \geq 0,9$ ) (130). Rezultati analize su prikazani u Tabeli 12.

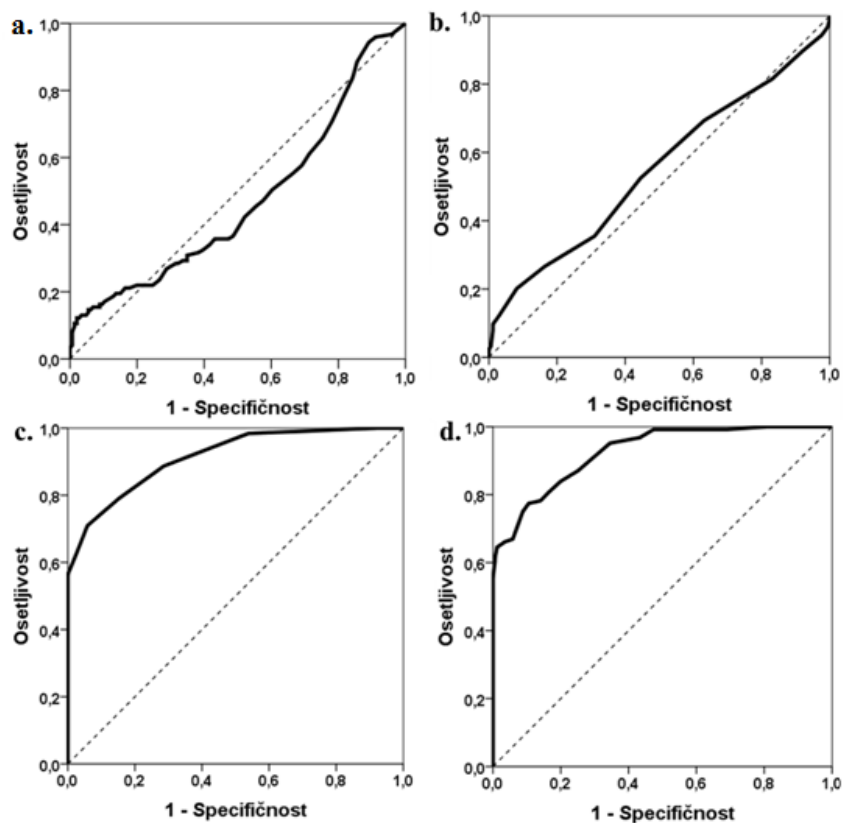
Analizom ROC krivih je utvrđeno da parametri oksidativnog stresa imaju izvanredan potencijal razdvajanja pacijenata sa HOBP od kontrolne grupe (TOS:  $AUC=0,914$ ;  $p<0,001$ ; OSI:  $AUC=0,925$ ;  $p<0,001$ ). Parametri antioksidativne zaštite i izloženosti duvanskom dimu su imali slab nivo dijagnostičke tačnosti. Grafički prikazi ROC krivih za parametre izloženosti duvanskom dimu, antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa prikazani su na Slici 14.

**Tabela 12.** Analiza ROC krivih za pojedinačne parametre izloženosti duvanskom dimu, antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa u razlikovanju pacijenata sa HOBP od zdravih ispitanika

Parametar	AUC	95% CI	Standardna greška	p
Kotinin/kreatinin (mg/mmol)	0,470	0,400-0,541	0,036	0,398
TAC (mmol Trolox Equiv./L)	0,550	0,482-0,618	0,035	0,145
TOS (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv./L)	0,914	0,882-0,946	0,016	<b>&lt;0,001</b>
OSI (TOS/TAC)	0,925	0,897-0,954	0,014	<b>&lt;0,001</b>

TOS-ukupni oksidativni status; TAC- ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks; AUC- površina ispod krive; 95% CI: 95% interval pouzdanosti; p-statistička značajnost ( $p<0,05$ ).





**Slika 14.** ROC krive (puna linija) za parametre izloženosti duvanskom dimu, antioksidativne zaštite i oksidativnog stresa: **a.** kotinin/kreatinin; **b.** ukupni antioksidativni kapacitet (TAC); **c.** ukupni oksidativni status (TOS); **d.** oksidativni indeks (OSI); isprekidana linija je referentna linija.

Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđene su cut-off vrednosti za parametre oksidativnog stresa. Cut-off vrednost za ukupni oksidativni status (TOS) je iznosila 0,055 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L (osetljivost 0,710; specifičnost 0,942). Sa ovom graničnom vrednošću moguće je dijagnostifikovati 71% osoba koje su obobile od HOBP (pravi pozitivni rezultati) i 94,2% osoba koje nemaju HOBP (pravi negativni rezultati), te je stoga ona predložena kao optimalna za razlikovanje pacijenata od zdravih ispitanika. Cut-off vrednost za oksidativni indeks (OSI) je iznosila 0,0175 (osetljivost 0,774; specifičnost 0,895) i ta vrednost razdvaja 77,4% pravih pozitivnih i 89,5 pravih negativnih rezultata, pri razlikovanju pacijenata od zdravih ispitanika.

#### 4.1.6. Analiza prediktora za nastanak HOBP

Jedan od ciljeva ove studije je ispitivanje prediktorskog potencijala parametara oksidativnog stresa, izloženosti duvanskom dimu, starosti i BMI u nastanku HOBP. Binarnom logističkom regresijom (metodom unosa, eng. enter), dobijen je model u okviru koga su identifikovani prediktori za nastanak HOBP (Tabela 13.). Daljom analizom, model je modifikovan prema polu i rezultati analize su prikazani u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Binarni model logističke regresije za predviđanje razvoja HOBP, kao i njegova modifikacija prema polu

Prediktori	Nemodifikovan model			Model modifikovan prema polu		
	$\beta$ (S.E)	p	OR (95% CI)	$\beta$ (S.E)	p	OR* (95% CI)
Kotinin/kreatinin (mg/mmol)	2,81 (2,24)	0,209	16,65 (0,21-1340,21)	3,43 (2,79)	0,219	30,76 (0,13-7255,87)
OSI	234,62 (92,68)	<b>0,011</b>	$7,7 \times 10^{101}$ ( $9,9 \times 10^{22}$ - $6,1 \times 10^{180}$ )	254,21 (108,58)	<b>0,019</b>	$2,5 \times 10^{110}$ ( $9,5 \times 10^{17}$ - $6,6 \times 10^{202}$ )
Starost (godine)	0,21 (0,065)	<b>0,001</b>	1,23 (1,09-1,40)	0,22 (0,07)	<b>0,002</b>	1,24 (1,09-1,42)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	-0,24 (0,11)	<b>0,028</b>	0,78 (0,63-0,97)	-0,24 (0,11)	<b>0,025</b>	0,78 (0,63-0,97)
Konstanta	-11,16 (4,42)	0,012	-	-11,89 (4,90)	0,015	-
Celokupni model	$\chi^2$ (df 4, N=117) = 108,57, p < 0,001			$\chi^2$ (df 5, N=117)=108,72, p < 0,001		

$\beta$  (S.E): koeficijent regresije  $\beta$  (standardna greška za  $\beta$ ); OR (95% CI): eng. odds ratio (95% interval pouzdanosti); OR\*-korigovane za pol; OSI-oksidativni indeks; BMI-indeks telesne mase;  $\chi^2$ -test-chi kvadrat test; p-statistička značajnost (p<0,05).

Celokupni model (sa svim prediktorima) bio je statistički značajan,  $\chi^2$  (df 4, N=117)=108,57, p<0,001. Ovaj model logističke regresije je objasnio između 60,5% (Cox and Snell R square) i 88,2% (Nagelkerke R squared) varijanse u razvoju HOBP i pravilno klasifikovao 95,7% pacijenata sa HOBP.

Kao što je prikazano u Tabeli 13., starenje i povećanje oksidativnog stresa (OSI), kao i smanjenje indeksa telesne mase (BMI) predstavljaju značajne nezavisne prediktore za nastanak HOBP. Najbolju prediktorsku moć za nastanak HOBP ima

povećanje oksidativnog indeksa (OSI). Statističkom analizom nije utvrđen uticaj nivoa kotinina/kreatinina, kao nezavisnog prediktora, na nastanak HOBP ( $p=0,209$ ).

Nakon modifikacije modela prema polu, nezavisne promenljive, starost i BMI su zadržali prediktivni uticaj na nastanak HOBP. Kao i u nemodifikovanom modelu, najjači prediktor za nastanak HOBP je oksidativni indeks (OSI). Međutim, i nakon modifikacije modela prema polu, uticaj kotinina/kreatinin kao prediktora nije bio značajan.

#### **4.1.7. Analiza kliničkih parametara pacijenata obolelih od HOBP prema težini bolesti**

Vrednosti kvantitativnih parametara dobijenih kod pacijenata obolelih od HOBP, dobijenih u grupama pacijenata podeljenih prema težini bolesti, su prikazani u Tabeli 14. Pacijenti su prema GOLD klasifikaciji svrstani u dve grupe. Jedna grupa je obuhvatila pacijente sa blagim i umerenim oblikom HOBP (GOLD I+II) a druga grupa, pacijente sa teškim i veoma teškim oblikom HOBP (GOLD III + IV). Dodatno, ove dve grupe pacijenata su podeljene i prema polu.

Očekivano, značajan pad plućne funkcije je bio kod pacijenata sa teškom i veoma teškom bolešću. Uticaj težine bolesti na smanjenu funkciju pluća je bio prisustan kod oba pola.

Takođe, značajno je da su muškarci imali viši nivo antioksidativne zaštite u odnosu na žene, u grupi pacijenta sa teškom i veoma teškom bolešću ( $p=0,045$ ).

**Tabela 14.** Kvantitativni parametri kod pacijenata obolelih od HOBP klasifikovanih prema težini bolesti

Parametri	Svi pacijenti sa HOBP (n=124)		Muškarci sa HOBP (n=73)		Žene sa HOBP (n=51)	
	GOLD (I+II)	GOLD (III+IV)	GOLD (I+II)	GOLD (III+IV)	GOLD (I+II)	GOLD (III+IV)
Starost, godine	67,68±8,91	64,23±7,70	66,89±5,82	64,74±8,35	68,40±11,29	63,46±6,65
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,55±4,21	23,17±5,43	24,99±4,60	23,31±5,17	27,54±2,14	22,92±6,24
Urinarni kotinin/kreatinin (mg/mmol)	0,21±0,23	0,24±0,27	0,16±0,13	0,22±0,22	0,26±0,29	0,28±0,33
TAC (mmol Trolox equiv./L)	2,84±0,35	2,78±0,28	2,86±0,35	2,83±0,27 <sup>e</sup>	2,83±0,37	2,71±0,27
TOS (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> equiv./L)	0,09±0,05	0,11±0,07	0,09±0,05	0,11±0,07	0,10±0,06	0,11±0,08
OSI (TOS/TAC)	0,03±0,02	0,04±0,03	0,03±0,02	0,04±0,03	0,04±0,02	0,04±0,03
FEV1, %	63,86±13,93 <sup>a</sup>	30,04±10,73	67,52±16,88 <sup>b</sup>	30,25±11,13	60,57±10,45 <sup>c</sup>	29,73±10,27
FVC, %	78,76±18,59 <sup>a</sup>	48,35±16,65	82,00±15,16 <sup>b</sup>	49,31±16,00	75,85±21,62 <sup>c</sup>	46,95±17,71
FEV1/FVC indeks	65,29±20,50 <sup>a</sup>	50,50±14,02	56,86±9,59	48,80±13,86	72,87±24,97 <sup>c</sup>	52,98±14,08

Vrednosti parametara su predstavljane kao: srednja vrednost±standardna devijacija. HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; GOLD (I+II)-grupa pacijenata sa blagom i umerenom HOBP; GOLD (III+IV)-grupa pacijenata sa teškom i umereno teškom HOBP; BMI-indeks telesne mase; FEV1%-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); FVC%-forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti); TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks. <sup>a</sup> u celoj HOBP populaciji: razlike između GOLD(I+II) i GOLD (III+IV); <sup>b</sup> u populaciji muškaraca: razlike između GOLD (I+II) i GOLD (III+IV); <sup>c</sup> u populaciji žena: razlike između GOLD(I+II) i GOLD (III+IV); <sup>d</sup> u GOLD (I+II) grupi: razlike između muškaraca i žena; <sup>e</sup> u GOLD (III+IV) grupi: razlike između muškaraca i žena; p-statistička značajnost (p<0.05).

#### 4.1.8. Korelacije između parametara plućne funkcije i parametara oksidativnog stresa kod pacijenata sa HOBP

Primenom Pearsonove korelacije, kod pacijenata smo identifikovali značajne korelacije između parametara plućne funkcije i parametara oksidativnog stresa (Tabela 15.). Statističkom analizom je pokazano da su oksidativni stres (indeks OSI) i spirometrijski parametri funkcije pluća u obrnutoj korelaciji, za FEV1 ( $p=0,018$ ) i za FVC ( $p=0,033$ ). Takođe, negativna korelacija između oksidativnog indeksa (OSI) i indeksa FEV1/FVC je bila blizu statistički značajne ( $p=0,066$ ).

Negativne korelacije su dobijene i između ukupnog oksidativnog statusa i spirometrijskih parametara pluća, za FEV1 ( $p=0,039$ ) i za FVC ( $p=0,036$ ).

Očekivano, kod pacijenata je primećena pozitivna korelacija između antioksidativne zaštite (TAC) i funkcije pluća (indeks FEV1/FVC) ( $p=0,007$ ).

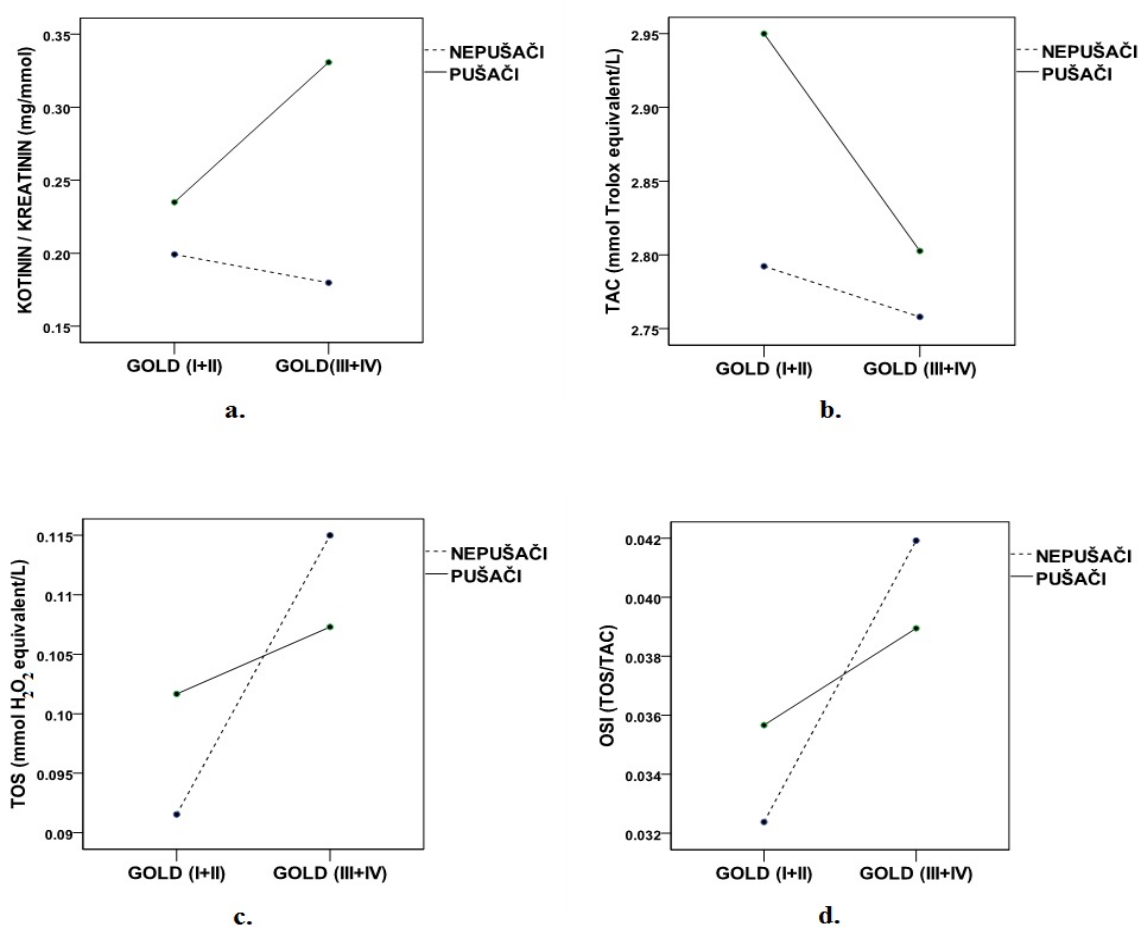
**Tabela 15.** Korelacije između parametara plućne funkcije i parametara oksidativnog stresa, kod HOBP-pacijenata

Klinički parametri	HOBP (n=124)
	r (p)
Kotinin/kreatinin i FEV1	-0,025 (0,802)
Kotinin/kreatinin i FVC	-0,063 (0,523)
Kotinin/kreatinin i FEV1/FVC	0,070 (0,480)
TAC i FEV1	0,162 (0,098)
TAC i FVC	0,007 (0,947)
TAC i FEV1/FVC	<b>0,263 (0,007)</b>
TOS i FEV1	<b>-0,202 (0,039)</b>
TOS i FVC	<b>-0,205 (0,036)</b>
TOS i FEV1/FVC	-0,141 (0,151)
OSI i FEV1	<b>-0,231 (0,018)</b>
OSI i FVC	<b>-0,209 (0,033)</b>
OSI i FEV1/FVC	-0,180 (0,066)

Podaci su predstavljeni kao: Pearsonov koeficijent korelacije r (statistička značajnost p). HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks; FEV1%-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); FVC%-forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti); r-Pearsonov koeficijent korelacije; p-statistička značajnost ( $p<0,05$ ).

#### 4.1.9. Analiza uticaja pušačkog statusa i težine bolesti na nivoe kotinina, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod HOBP pacijenata

Dvo-faktorska ANOVA metod (two-way ANOVA) je korišćen da bi se ispicao uticaj pušenja i težine bolesti na nivoe urinarnog kotinina/kreatinina, antioksidativne zaštite (TAC) i oksidativnog stresa (TOS i OSI) kod pacijenata, koji su podeljeni prema težini bolesti (Slika 15. i Tabela 16.).



**Slika 15.** Aritmetičke srednje vrednosti kotinina i parametara oksidativnog stresa/antioksidativne zaštite kod HOBP-pacijenata podeljenih prema težini bolesti i pušačkom statusu; **a.** kotinin/kreatinin (mg/mmol); **b.** ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) (mmol Trolox equivalent/L); **c.** ukupni oksidativni status (TOS) (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent/L); **d.** oksidativni indeks (OSI).

GOLD-Globalna inicijativa za hroničnu opstruktivnu bolest pluća; GOLD (I+II)-grupa pacijenata sa blagom i umerenom HOBP; GOLD (III+IV)-grupa pacijenata sa teškom i veoma teškom HOBP.

**Tabela 16.** Testiranje uticaja individualnih faktora (težina bolesti i pušački status) i njihovih interakcija na nivoe kotinina, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
Kotinin/ kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (GOLD I+II i GOLD III+IV)	0,585	0,003
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,183	0,017
	Težina HOBP*pušenje	0,683	0,007
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Pušenje: težina HOBP (GOLD III+IV)	<b>0,009</b>	<b>0,067</b>
TAC	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (GOLD I+II i GOLD III+IV)	0,248	0,013
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,198	0,016
	Težina HOBP *pušenje	0,471	0,005
TOS	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (GOLD I+II i GOLD III+IV)	0,443	0,006
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,949	<0,001
	Težina HOBP *pušenje	0,638	0,002
OSI	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (GOLD I+II i GOLD III+IV)	0,366	0,008
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,983	<0,001
	Težina HOBP *pušenje	0,659	0,002

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; GOLD-Globalna inicijativa za hroničnu opstruktivnu bolest pluća; GOLD (I+II)-grupa pacijenata sa blagom i umerenom HOBP; GOLD (III+IV)-grupa pacijenata sa teškom i veoma teškom HOBP; TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks; p-statistička značajnost ( $p < 0,05$ ).

Primenom testa, dvo-faktorska ANOVA (two-way ANOVA), utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u nivou kotinina između pacijenata podeljenih prema težini bolesti ( $p=0,585$ ; eta kvadrat=0,003), prema statusu pušenja ( $p=0,183$ ; eta kvadrat=0,017), kao ni između grupa koje su podeljene prema oba kriterijuma (težini bolesti i pušački status) ( $p=0,683$ ; eta kvadrat=0,007) (Tabela 16.). Primenom Šidak testa, analiziran je uticaj pušenja na nivo kotinina u grupama pacijenata koje su se razlikovale prema težini bolesti (Slika 15a.). Iako dvo-faktorska ANOVA nije pokazala značajan uticaj interakcije težine bolesti i pušenja na nivo kotinina, primenom Šidak testa je utvrđeno da pušenje ima uticaja na nivo kotinina kod pacijenata sa teškom i

veoma teškom bolešću. Tako su pušači imali značajno viši nivo kotinina u grupi HOBP-pacijenata sa teškom i veoma teškom bolešću ( $p=0,009$ ; eta kvadrat=0,067) (Slika 15a.).

Statističkom analizom je pokazano da na nivo antioksidativne zaštite (TAC) ne utiče ni težina bolesti ( $p=0,248$ ; eta kvadrat=0,013), ni pušenje ( $p=0,198$ ; eta kvadrat=0,016), kao ni interakcija između pušačkog statusa i težine bolesti ( $p=0,471$ ; eta kvadrat<0,005) (Tabela 16.). Pacijenti sa blagom i umerenom bolešću su imali viši nivo antioksidativne zaštite, ali razlike nisu bile statistički značajne (Slika 15b.).

Analizom uticaja pušačkog statusa i težine bolesti na parametre oksidativnog stresa (TOS i OSI), nije uočen značajan uticaj pušenja (za TOS:  $p=0,949$ ; eta kvadrat<0,001; za OSI:  $p=0,983$ ; eta kvadrat<0,001), ni težine bolesti (za TOS:  $p=0,443$ ; eta kvadrat=0,006; za OSI:  $p=0,366$ ; eta kvadrat=0,008), kao ni interakcije ovih faktora (za TOS:  $p=0,638$ ; eta kvadrat=0,002; za OSI:  $p=0,659$ ; eta kvadrat=0,002) (Tabela 16.). Iako se na graficima zapaža da su pacijenti sa teškom i veoma teškom bolešću imali više vrednosti oksidativnog stresa, posebno u grupi nepušača, ove razlike nisu bile statistički značajne (Slika 15c. i Slika 15d.).

#### **4.1.10. Analiza uticaja pušačkog statusa, pola i težine bolesti na nivoe kotinina, oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite kod HOBP pacijenata**

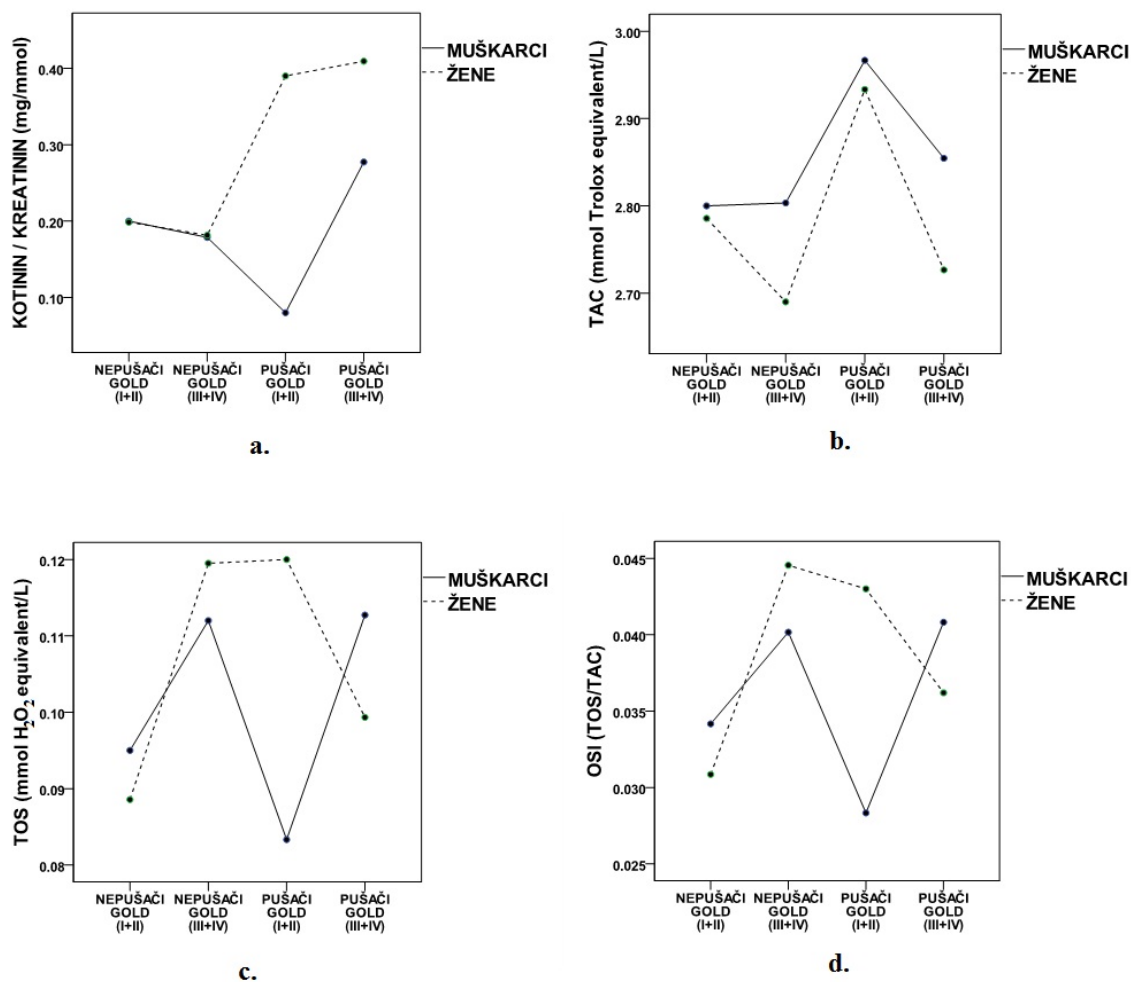
Grafički prikaz rezultata ispitivanja uticaja pušenja, pola i težine bolesti na nivoe urinarnog kotinina/kreatinina, oksidativnog stresa (TOS i OSI) i antioksidativne zaštite (TAC) je prikazan na Slici 16.

Primenom testa, tro-faktorska ANOVA (three-way ANOVA), utvrđeno je da se nivo urinarnog kotinina ne razlikuje prema polu ( $p=0,115$ ; eta kvadrat=0,025), pušačkom statusu ( $p=0,157$ ; eta kvadrat=0,021), težini bolesti ( $p=0,525$ ; eta kvadrat=0,004), kao ni između grupa koje su podeljene prema sva tri kriterijuma (pol, pušački status i težina bolesti) (Tabela 17. i Slika 16a.).

Tro-faktorskom ANOVA metodom je utvrđeno da se nivo antioksidativne zaštite ne razlikuje prema polu ( $p=0,361$ ; eta kvadrat=0,009), pušačkom statusu ( $p=0,204$ ; eta kvadrat=0,016), težini bolesti ( $p=0,194$ ; eta kvadrat=0,017), kao ni između grupa koje su podeljene prema sva tri kriterijuma (pol, pušački status i težina bolesti) (Tabela 17. i Slika 16b.).



Takođe, utvrđeno je da i na nivo oksidativnog stresa ne utiče pol (TOS:  $p=0,756$ ; eta kvadrat= $0,001$ ; OSI:  $p=0,700$ ; eta kvadrat= $0,002$ ), pušenje (TOS:  $p=0,997$ ; eta kvadrat $<0,001$ ; OSI:  $p=0,962$ ; eta kvadrat $<0,001$ ), težina bolesti (TOS:  $p=0,464$ ; eta kvadrat= $0,005$ ; OSI:  $p=0,380$ ; eta kvadrat= $0,008$ ), kao ni interakcije ovih nezavisnih faktora (Tabela 17., Slika 16c. i Slika 16d.).



**Slika 16.** Vrednosti kliničkih parametara kod HOBP-pacijenata ( $n=124$ ), prema pušenju, polu i težini bolesti; **a.** kotinin/kreatinin (mg/mmol); **b.** ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) (mmol Trolox equivalent/L); **c.** ukupni oksidativni status (TOS) (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent/L); **d.** oksidativni indeks (OSI).

GOLD-Globalna inicijativa za hroničnu opstruktivnu bolest pluća; GOLD (I+II)-grupa pacijenata sa blagom i umerenom HOBP; GOLD (III+IV)-grupa pacijenata sa teškom i veoma teškom HOBP.

**Tabela 17.** Testiranje uticaja individualnih faktora (pol, težina bolesti i pušačk status) i njihovih interakcija na nivoe kotinina, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
<b>Kotinin/ kreatinin</b>	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (I+II i III+IV)	0,525	0,004
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,157	0,021
	Pol (muškarci/žene)	0,115	0,025
	Težina HOBP*pušenje	0,363	0,009
	Težina HOBP*pol	0,535	0,004
	Pušenje*pol	0,118	0,025
	Težina HOBP*pušenje*pol	0,515	0,004
<b>TAC</b>	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (I+II i III+IV)	0,194	0,017
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,204	0,016
	Pol (muškarci/žene)	0,361	0,009
	Težina HOBP*pušenje	0,473	0,005
	Težina HOBP*pol	0,540	0,004
	Pušenje*pol	0,915	<0,001
	Težina HOBP*pušenje*pol	0,989	<0,001
<b>TOS</b>	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (I+II i III+IV)	0,464	0,005
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,997	<0,001
	Pol (muškarci/žene)	0,756	0,001
	Težina HOBP*pušenje	0,612	0,003
	Težina HOBP*pol	0,640	0,002
	Pušenje*pol	0,774	0,001
	Težina HOBP*pušenje*pol	0,408	0,007
<b>OSI</b>	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina HOBP (I+II i III+IV)	0,380	0,008
	Pušenje (pušači/nepušači)	0,962	<0,001
	Pol (muškarci/žene)	0,700	0,002
	Težina HOBP*pušenje	0,627	0,002
	Težina HOBP*pol	0,688	0,002
	Pušenje*pol	0,756	0,001
	Težina HOBP*pušenje*pol	0,350	0,009

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; GOLD-Globalna inicijativa za hroničnu opstruktivnu bolest pluća; GOLD (I+II)-grupa pacijenata sa blagom i umerenom HOBP; GOLD (III+IV)-grupa pacijenata sa teškom i veoma teškom HOBP; TOS-ukupni oksidativni status; TAC-ukupni antioksidativni kapacitet; OSI-oksidativni indeks; p-statistička značajnost ( $p < 0,05$ ).

## **4.2. Genetski i ne-genetski faktori rizika za nastanak i razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP)**

### **4.2.1. Karakteristike ispitanika**

Drugi deo studije obuhvatio je 71-og pacijenta (33 muškarca i 38 žena, starosne dobi  $57,39 \pm 7,61$  godina) obolelog od hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) i 153 kontrolna ispitanika (85 muškarca i 68 žena, starosne dobi  $45,98 \pm 10,17$  godina) kod kojih je isključeno prisustvo HOBP.

Kvalitativne i kvantitativne karakteristike obolelih od HOBP i kontrolnih ispitanika, kao i njihove karakteristike prema polu, prikazane su u Tabeli 18. Za procenu sistemskih efekata oksidativnog stresa, u urinu svih ispitanika izmeren je 8-oxodG (8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin) i izražen je kao indeks 8-oxodG/kreatinin. Za svakog ispitanika prikupljeni su podaci o pušačkom statusu i na osnovu njih ispitanici su podeljeni u tri grupe: pušači, bivši pušači i nepušači.

Poređenjem osnovnih karakteristika između pacijenata i kontrole, uočeno je da su pacijenti bili nešto stariji, sa većom učestalošću bivših pušača, višim vrednostima kumulativnog dejstva duvanskog dima (izraženo kao paklo/godine), a nižim vrednostima serumskog kreatinina i indeksa telesne mase ( $p < 0,05$ ). Nivoi oksidativnog stresa (procenjen na osnovu urinarnog 8-oxodG/kreatinina), leukocita i trombocita su bili značajno viši kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,05$ ). Kod pacijenata je uočeno i prisustvo karakterističnog znaka anemije (nizak nivo hemoglobina koji je u korelaciji sa smanjenjem broja eritrocita), u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,05$ ). Iste razlike između kontrole i pacijenata su bile prisutne i u populacijama muškaraca i žena.

Osnovne karakteristike svih ispitanika su analizirane i prema pušačkom statusu (Tabela 19.). Za ovu analizu ispitanici su podeljeni u tri grupe: nepušači, bivši pušači i pušači. Rezultati ove analize su pokazali značajan uticaj pušenja (u grupama pušača i bivših pušača) na povećanje nivoa urinarnog 8-oxodG/kreatinina kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,05$ ).

Takođe, analiziran je i uticaj starosti na kvantitativne parametre svih ispitanika (Tabela 20.). Za ovu analizu svi ispitanici su podeljeni u dve grupe, ispitanici mlađi od 50 godina i ispitanici stariji od 50 godina. U kontrolnoj grupi, ispitanici stariji od 50 godina su imali značajno viši nivo 8-oxodG/kreatinina u odnosu na mlađe ispitanike ( $p = 0,003$ ). Rezultati su pokazali da starost nema uticaja na već postojeće razlike između kontrole i pacijenata ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 18.** Kvalitativne i kvantitativne karakteristike u grupi svih zdravih ispitanika i HOBP-pacijenata kao i grupama podjeljenih prema polu

Karakteristike i parametri	Svi (n=224)		Muškarci (n=118)		Žene (n=106)	
	Kontrola (n=153)	HOBP (n=71)	Kontrola (n=85)	HOBP (n=33)	Kontrola (n=68)	HOBP (n=38)
Starost, godine	45,98±10,17 <sup>a</sup>	57,39±7,61	43,60±9,76 <sup>b,e</sup>	59,56±6,43 <sup>d</sup>	48,96±9,96 <sup>c</sup>	55,51±8,12
Pušački status, pušači (%)	50,67	49,30	47,62	39,39	54,69	57,89
Pušački status, nepušači (%)	33,11 <sup>a</sup>	7,04	30,95 <sup>b</sup>	3,03	35,94 <sup>c</sup>	10,53
Pušački status, bivši pušači (%)	16,22 <sup>a</sup>	43,66	21,43 <sup>b,e</sup>	57,58 <sup>d</sup>	9,37 <sup>c</sup>	31,58
Paklo/godine	19,66±13,35 <sup>a</sup>	42,02±26,49	19,24±12,17 <sup>b</sup>	52,31±31,56 <sup>d</sup>	20,27±15,04 <sup>c</sup>	32,32±15,71
Urinarni 8-oxodG/kreatinin (nmol/mmol)	1,21±0,60 <sup>a</sup>	2,97±2,03	1,01±0,44 <sup>b,e</sup>	3,24±2,24	1,46±0,68 <sup>c</sup>	2,72±1,83
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,32±3,79 <sup>a</sup>	25,44±6,48	26,82±3,28 <sup>e</sup>	26,65±6,43	25,64±4,33	24,41±6,42
Serumski kreatinin (μmol/L)	78,86±12,83 <sup>a</sup>	59,06±15,75	86,26±11,16 <sup>b,e</sup>	63,24±15,14 <sup>d</sup>	69,60±7,81 <sup>c</sup>	55,42±15,54
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	4,76±0,39 <sup>a</sup>	4,62±0,71	4,97±0,32 <sup>b,e</sup>	4,79±0,77 <sup>d</sup>	4,50±0,29	4,47±0,63
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	7,15±1,76 <sup>a</sup>	10,80±4,63	7,38±1,67 <sup>b,e</sup>	10,18±4,60	6,86±1,84 <sup>c</sup>	11,34±4,65
Hemoglobin (g/L)	144,61±12,22 <sup>a</sup>	136,50±18,35	152,51±8,71 <sup>b,e</sup>	140,82±19,67 <sup>d</sup>	134,75±8,13	132,65±16,41
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	228,58±55,80 <sup>a</sup>	264,52±88,90	222,91±54,87	254,07±98,54	235,66±56,56 <sup>c</sup>	273,32±80,18
FEV1, %	-	46,07±20,98	-	42,91±18,57	-	48,89±22,81
FVC, %	-	74,36±21,97	-	73,42±21,05	-	75,19±23,02
FEV1/FVC indeks	-	61,15±17,64	-	57,52±17,39	-	64,39±17,45

Kvantitativne vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti±standardna devijacija (Sd). HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; BMI-indeks telesne mase; FEV1%-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); FVC%-forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti); <sup>a</sup> u celjoj populaciji: razlike između kontrole i HOBP; <sup>b</sup> u populaciji muškaraca: razlike između kontrole i HOBP; <sup>c</sup> u populaciji žena: razlike između kontrole i pacijenata; <sup>d</sup> u HOBP populaciji: razlike između muškaraca i žena; <sup>e</sup> u kontrolnoj populaciji: razlika između muškaraca i žena; p-statistička značajnost (p<0,05).

**Tabela 19.** Kvantitativne karakteristike u grupi svih zdravih ispitanika i HOBP-pacijenata kao i u grupama podeljenih prema pušačkom statusu

Parametri	Kontrola (n=153)			HOBP (n=71)		
	Nepušači (n=54)	Bivši pušači (n=24)	Pušači (n=75)	Nepušači (n=5)	Bivši pušači (n=31)	Pušači (n=35)
Starost, godine	47,84±10,85	46,92±7,39 <sup>b</sup>	44,25±10,27 <sup>c</sup>	53,40±8,74	59,13±6,56	56,44±8,13
Paklo/godine	-	15,78±10,28 <sup>b</sup>	21,41±13,77 <sup>c</sup>	-	45,26±28,27	39,14±24,87
Urinarni 8-oxodG/kreatinin (nmol/mmol)	1,23±0,70	1,05±0,42 <sup>b</sup>	1,22±0,57 <sup>c</sup>	1,81±0,36	3,39±2,23	2,81±1,89
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,20±4,00	26,66±3,69 <sup>b</sup>	26,28±3,73	27,87±5,62	24,68±6,33	25,82±6,75
Serumski kreatinin (μmol/L)	81,45±15,79 <sup>a</sup>	82,67±11,50 <sup>b</sup>	76,21±10,42 <sup>c</sup>	61,60±14,43	60,00±20,48	57,86±10,62
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	4,75±0,40	4,85±0,46	4,75±0,36 <sup>c</sup>	4,34±0,78	4,71±0,65	4,58±0,76
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	6,45±1,45 <sup>a</sup>	6,90±1,59 <sup>b</sup>	7,73±1,84 <sup>c</sup>	11,04±1,67	11,36±5,63	10,28±3,91
Hemoglobin (g/L)	143,10±12,86 <sup>a</sup>	146,50±13,51	145,33±11,58 <sup>c</sup>	126,20±16,19	138,16±19,15	136,55±17,94
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	229,04±54,85	242,63±60,45	225,17±55,79 <sup>c</sup>	238,40±47,78	272,56±109,98	261,03±71,25
FEV1, %	-	-	-	47,40±17,83	41,90±19,35	49,46±22,57
FVC, %	-	-	-	78,60±21,35	74,20±20,47	73,89±23,79
FEV1/FVC indeks	-	-	-	61,65±17,74	55,21±17,38	66,17±16,72

Kvantitativne vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti±standardna devijacija (Sd). HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; BMI-indeks telesne mase; FEV1%-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); FVC%-forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti); <sup>a</sup> u populaciji nepušača: razlike između kontrole i HOBP; <sup>b</sup> u populaciji bivših pušača: razlike između kontrole i HOBP; <sup>c</sup> u populaciji pušača: razlike između kontrole i HOBP; p-statistička značajnost (p<0,05).

**Tabela 20.** Kvalitativne i kvantitativne karakteristike u grupi svih zdravih ispitanika i HOBP-pacijenata kao i u grupama podjeljenih prema godinama starosti

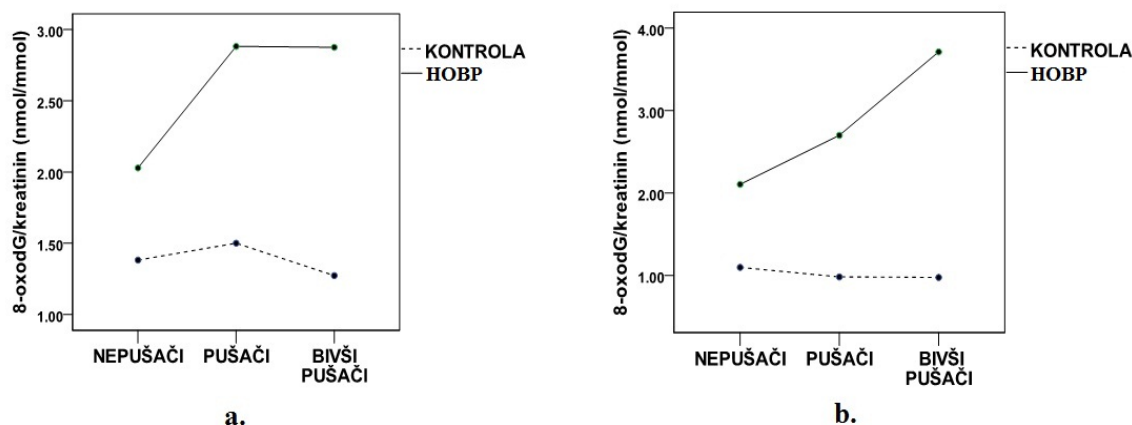
Karakteristike i parametri	Kontrola (n=153)		HOBP (n=71)	
	Starost < 50 godina (n=95)	Starost > 50 godina (n=58)	Starost < 50 godina (n=15)	Starost > 50 godina (n=56)
Pušački status, pušači (%)	52,69	47,27	53,85	48,21
Pušački status, nepušači (%)	29,03	40,00 <sup>b</sup>	15,38	5,36
Pušački status, bivši pušači (%)	18,28	12,73 <sup>b</sup>	30,77	46,43
Paklo/godine	16,42±9,85 <sup>a,c</sup>	26,34±16,91 <sup>b</sup>	33,36±17,68	43,13±27,44
Urinarni 8-oxodG/kreatinin (nmol/mmol)	1,10±0,51 <sup>a,c</sup>	1,39±0,69 <sup>b</sup>	2,62±2,32	3,03±1,97
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,27±4,14	26,41±3,16	24,39±6,81	25,68±6,56
Serumski kreatinin (µmol/L)	79,44±12,41 <sup>a</sup>	77,90±13,54 <sup>b</sup>	50,00±10,13 <sup>d</sup>	61,20±16,39
Eritrociti (x10 <sup>12</sup> /L)	4,85±0,38 <sup>a,c</sup>	4,63±0,35	4,32±0,47	4,71±0,73
Leukociti (x10 <sup>9</sup> /L)	7,47±1,84 <sup>a,c</sup>	6,62±1,48 <sup>b</sup>	11,58±3,99	10,60±4,82
Hemoglobin (g/L)	147,05±12,88 <sup>a,c</sup>	140,62±9,94	128,93±16,37	138,53±18,49
Trombociti (x10 <sup>9</sup> /L)	226,21±53,38 <sup>a</sup>	232,45±59,83	276,71±88,67	259,46±88,54
FEV1, %	-	-	52,15±28,67	44,33±18,96
FVC, %	-	-	72,15±28,19	74,35±20,76
FEV1/FVC indeks	-	-	68,23±16,04	59,48±17,84

Kvantitativne vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti±standardna devijacija (Sd). HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; BMI-indeks telesne mase; FEV1%-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); FVC%-forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti); <sup>a</sup> u grupi < 50 godina: razlike između kontrole i HOBP; <sup>b</sup> u grupi > 50 godina: razlike između kontrole i HOBP; <sup>c</sup> u kontrolnoj grupi: razlika između < 50 i > 50 godina; <sup>d</sup> u grupi HOBP: razlika između < 50 i > 50 godina; p-statistička značajnost (p<0,05).

#### 4.2.2. Analiza uticaja pola i pušačkih navika na nivo 8-oxodG/kreatinina u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP

Na osnovu prethodnih rezultata, gde je prikazano da pušenje utiče na povišen nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina kod pacijenata, ispitali smo da li postoji uticaj pola na ove razlike i pušačkog statusa. Muškarci i žene su podeljeni prema pušačkom statusu u tri grupe, nepušači, pušači i bivši pušači (Slika 17.). Rezultati testiranja uticaja prisustva/odsustva HOBP, pola i pušačkog statusa, kao i interakcije ovih nezavisnih promenljivih na nivo 8-oxodG/kreatinina su prikazani u Tabeli 21.

Primenom testa, tro-faktorska ANOVA (three-way ANOVA), utvrđeno je da na nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina utiče samo prisustvo bolesti ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,124), dok pol ( $p = 0,825$ ; eta kvadrat < 0,001), pušenje ( $p = 0,361$ ; eta kvadrat=0,010) i interakcije ovih nezavisnih faktora nemaju statistički značajan uticaj (Tabela 21.). Daljom analizom, korišćenjem Šidak testa analiziran je uticaj prisustva bolesti u grupama ispitanika koje su se razlikovale prema polu i pušačkom statusu. Utvrđeno je da se nivo 8-oxodG/kreatinina razlikuje kod pušača i bivših pušača u zavisnosti od prisustva/odsustva bolesti, u obe ispitivane grupe (Slika 17.). Kod oba pola, pacijenti su imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u grupi pušača (za žene:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,076; za muškarce: ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,085) i u grupi bivših pušača (za žene:  $p = 0,010$ ; eta kvadrat=0,032; za muškarce:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,178).



**Slika 17.** Srednje vrednosti urinarnog 8-oxodG/kreatinina (nmol/mmol) kod HOBP-pacijenata i kontrole, prema pušačkom statusu: **a.** u populaciji žena; **b.** u populaciji muškaraca.

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksi-guanozin.

**Tabela 21.** Testiranje uticaja, veličine uticaja individualnih faktora (zdravstveno stanje, pušački status i pol) i njihovih interakcija na nivo 8-oxodG/kreatinina

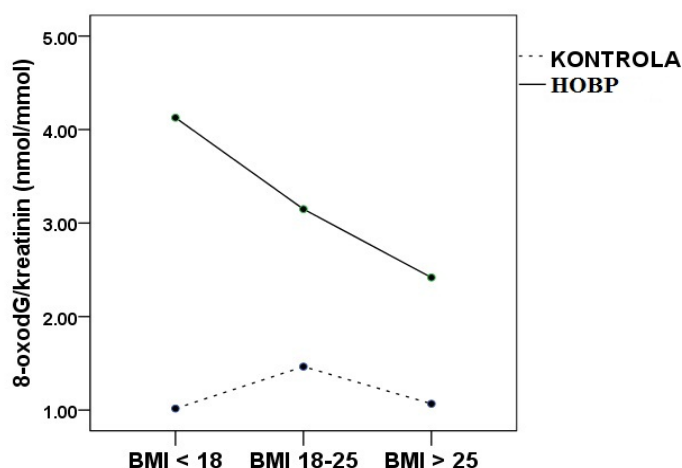
Zavisna promenjiva	Uticaaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
<b>8-oxodG/kreatinin</b>	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,124</b>
	Pol (muškarci/žene)	0,825	<0,001
	Pušenje (nepušači/bivši pušači/pušači)	0,361	0,010
	Stanje*pol	0,278	0,006
	Stanje*pušenje	0,181	0,017
	Pol*pušenje	0,391	0,009
	Stanje*pol*pušenje	0,669	0,004
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje: muškarci-nepušači	0,423	0,003
	Stanje: muškarci-bivši pušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,178</b>
	Stanje: muškarci-pušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,085</b>
	Stanje: žene-nepušači	0,333	0,005
	Stanje: žene-bivši pušači	<b>0,010</b>	<b>0,032</b>
	Stanje: žene-pušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,076</b>

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; p-statistička značajnost (p<0,05).

#### 4.2.3. Analiza uticaja indeksa telesne mase (BMI) na nivo 8-oxodG/kreatinina u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA (two-way ANOVA) analiziran je uticaj indeksa telesne mase (BMI) na nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina u kontrolnoj grupi i grupi pacijenta obolelih od HOBP (Slika 18. i Tabela 22.). Pacijenti oboleli od HOBP i kontrolni ispitanici su prema BMI podeljeni u tri grupe: BMI<18 kg/m<sup>2</sup> (neuhranjeni), BMI 18-25 kg/m<sup>2</sup> (normalne telesne mase) i BMI >25 kg/m<sup>2</sup> (prekomerno gojazni) (Slika 18.).





**Slika 18.** Aritmetičke srednje vrednosti urinarnog 8-oxodG/kreatinina (nmol/mmol) kod HOBP-pacijenata i kontrole podeljenih prema indeksu telesne mase (BMI, kg/m<sup>2</sup>).

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; BMI-indeks telesne mase; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin.

**Tabela 22.** Testiranje uticaja, veličine uticaja individualnih faktora (zdravstveno stanje, BMI) i njihovih interakcija na nivo 8-oxodG/kreatinina

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
8-oxodG/kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<0,001	0,196
	BMI (<18/18-25/>25)	0,003	0,055
	Stanje*BMI	0,094	0,023
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje: BMI<18	<0,001	0,070
	Stanje: BMI 18-25	<0,001	0,167
	Stanje: BMI>25	<0,001	0,132
	BMI: kontrola	0,154	0,018
	BMI: HOBP	0,001	0,067

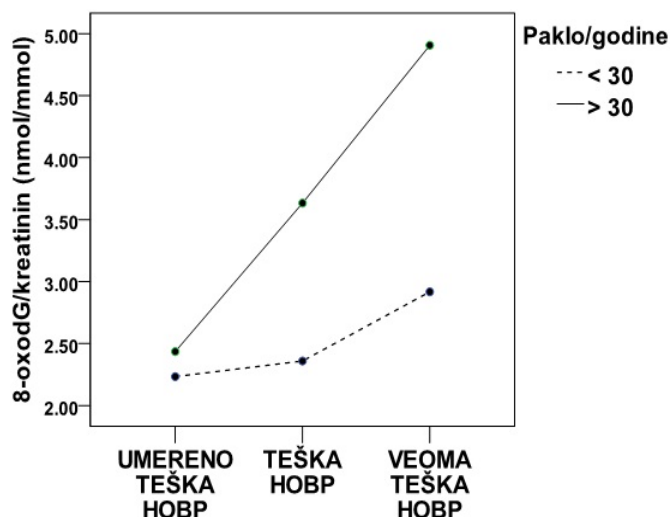
HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; BMI-indeks telesne mase; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; p-statistička značajnost (p<0,05).

Statističkom analizom je utvrđeno da na nivo 8-oxodG/kreatinina utiču prisustvo bolesti (p<0,001; eta kvadrat=0,196) i BMI (p=0,003; eta kvadrat=0,055), dok interakcija ovih nezavisnih faktora ne utiče (p=0,094; eta kvadrat=0,023) (Tabela 22.). Primenom Šidak testa analiziran je uticaj prisustva bolesti u grupama ispitanika koje su

se razlikovale prema vrednostima BMI. Na osnovu rezultata analize, utvrđeno je da su pacijenti imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u odnosu na zdrave u sve tri ispitivane grupe (za BMI<18: p<0,001; eta kvadrat=0,070; za BMI 18-25: p<0,001; eta kvadrat=0,167; za BMI>25: p<0,001; eta kvadrat=0,132) (Slika 18.). Uticaj BMI na nivo 8-oxodG/kreatinina je bio značajan u grupi pacijenata (p=0,001; eta kvadrat=0,067), ali ne i u kontrolnoj grupi (p=0,154; eta kvadrat=0,018). Neuhranjeni pacijenti sa (BMI<18 kg/m<sup>2</sup>) su imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u odnosu na pacijente sa normalnom telesnom masom (BMI 18-25 kg/m<sup>2</sup>) (4,13±3,09 vs. 3,15±1,83, p=0,039) i gojazne (BMI >25 kg/m<sup>2</sup>) (4,13±3,09 vs. 2,42±1,47, p=0,001) (Slika 18.).

#### 4.2.4. Analiza uticaja kumulativnog dejstva duvanskog dima i težine bolesti na nivo 8-oxodG/kreatinina

Analiziran je udruženi uticaj kumulativnog dejstva duvanskog dima i težine bolesti na nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina kod pacijenata (Slika 19.). Pacijenti su prema težini bolesti podeljeni u tri grupe: pacijenti sa umerenom, teškom i veoma teškom HOBP (prema GOLD klasifikaciji). Na osnovu vrednosti kumulativnog dejstva duvanskog dima (paklo/godine), pacijenti su podeljeni u dve grupe: umereni pušači (<30 paklo/godine) i teški pušači (>30 paklo/godine).



**Slika 19.** Srednje vrednosti urinarnog 8-oxodG/kreatinina (nmol/mmol) kod HOBP-pacijenata, prema težini bolesti i težini pušenja.

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin.

**Tabela 23.** Testiranje uticaja, veličine uticaja individualnih faktora (težina bolesti i težina pušenja) i njihovih interakcija na nivo 8-oxodG/kreatinina

Zavisna promenjiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
<b>8-oxodG/kreatinin</b>	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Težina bolesti (umereno teška/teška/veoma teška HOBP)	<b>0,033</b>	<b>0,109</b>
	Težina pušenja (<30/>30 paklo/godine)	<b>0,020</b>	<b>0,088</b>
	Težina bolesti*težina pušenja	0,306	0,039
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Težina pušenja: umereno teška HOBP	0,793	0,001
	Težina pušenja: teška HOBP	0,143	0,036
	Težina pušenja: veoma teška HOBP	<b>0,029</b>	<b>0,078</b>
	Težina bolesti: <30 paklo/godine	0,665	0,014
	Težina bolesti: >30 paklo/godine	<b>0,022</b>	<b>0,121</b>

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; p-statistička značajnost (p<0,05).

Primenom testa, dvo-faktorska ANOVA (two-way ANOVA), utvrđeno je da na nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina utiču i težina bolesti (p=0,033; eta kvadrat=0,109) i težina pušenja (p=0,020; eta kvadrat p=0,088), dok interakcija ovih nezavisnih faktora ne utiče (p=0,306; eta kvadrat=0,039) (Tabela 23.). Daljom analizom, korišćenjem Šidak testa, utvrđeno je da se nivo 8-oxodG/kreatinina razlikuje kod pacijenata sa veoma teškom HOBP u zavisnosti od težine pušenja. Teški pušači su imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u odnosu na umerene pušače, u grupi pacijenata sa veoma teškom HOBP (p=0,029; eta kvadrat=0,078). Dodatno, teški pušači sa veoma teškom HOBP su imali značajno više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u odnosu na one sa umereno teškom bolešću (4,91±0,68 vs. 2,44±0,55, p=0,019) (Slika 19.).

#### **4.2.5. Analiza ROC krive (Receiving Operating Characteristic Curve) za 8-oxodG/kreatinin**

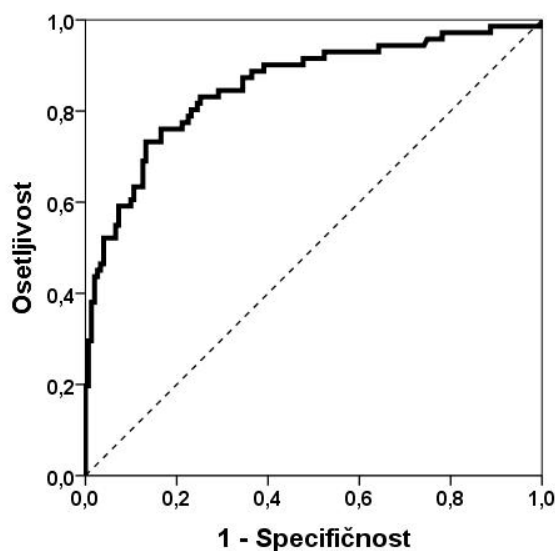
Analizom ROC krive proverena je dijagnostička tačnost parametra 8-oxodG/kreatinina u razlikovanju pacijenata sa HOBP od zdravih ispitanika. Površina ispod krive (AUC) bila je mera tačnosti parametra 8-oxodG/kreatinina u identifikovanju

pacijenata sa HOBP. Primenom Hosmer-Lemeshow pravila, potencijal parametra je definisan kao slab ( $0,5 \leq AUC < 0,7$ ), prihvatljiv ( $0,7 \leq AUC < 0,8$ ), odličan ( $0,8 \leq AUC < 0,9$ ) i izvanredan ( $AUC \geq 0,9$ ) (130). Analizom ROC krivih je utvrđeno da 8-oxodG/kreatinin ima odličan potencijal razdvajanja pacijenata sa HOBP od kontrolne grupe ( $AUC=0,855$ ;  $p<0,001$ ) (Tabela 24.). Grafički prikaz ROC krive za 8-oxodG/kreatinin je prikazan Slici 20.

**Tabela 24.** Analiza ROC krive za 8-oxodG/kreatinin u razlikovanju pacijenata sa HOBP od kontrolne grupe

Parametar	AUC	95% CI	Standardna greška	p
8-oxodG/kreatinin (nmol/mmol)	0,855	0,798-0,913	0,029	<0,001

8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; AUC-površina ispod krive; 95% CI: 95% interval pouzdanosti; p-statistička značajnost ( $p<0,05$ ).



**Slika 20.** Analiza ROC krive (puna linija) za 8-oxodG/kreatinin (isprekidana linija je referentna linija).

Utvrđena je cut-off vrednost za 8-oxodG/kreatinin koja iznosi 1,69 nmol/mmol (osetljivost 0,732; specifičnost 0,868). Sa ovom graničnom vrednošću, test klasifikuje 73,2% osoba sa HOBP (pravi pozitivni rezultati) i 86,8% osoba bez HOBP (pravi negativni rezultati), te je stoga ova vrednost optimalna za razlikovanje pacijenata od zdravih ispitanika.

#### 4.2.6. Analiza funkcionalnih genskih varijanti enzima uključenih u metabolizam ksenobiotika

U ovoj studiji analizirane su funkcionalne varijante gena koji kodiraju pro- i anti-oksidativne enzime, a koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika: CYP1A1 \*1A/\*2A, GSTM1 \*nulti, GSTT1 \*nulti, GSTP1 Ile105Val, mEPHX (S i F), kod kontrolnih ispitanika i pacijenata obolelih od HOBP.

Analizom genskih varijanti ispitivanih enzima određene su distribucije alela, genotipova i kombinacija genotipova u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP. Za sve analizirane genske varijante testirana je Hardy-Weinberg-ova ravnoteža (Tabela 25.). Takođe, testirana je statistička značajnost razlike u distribuciji alela i genotipova između kontrolne grupe i pacijenata obolelih od HOBP.

Frekvence analiziranih alela i genotipova kod pacijenata i kontrole su bile u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži ( $p > 0,05$ ). Poređenjem učestalosti analiziranih alela i genotipova nije oučena statistički značajna razlika između kontrole i pacijenata ( $p > 0,05$ ) (Tabela 25.).

**Tabela 25.** Distribucija alela i genotipova (%) gena u grupi HOBP-pacijenata i kontrolnoj grupi

Genotipovi / aleli	HOBP-pacijenti (n=71)	Kontrola (n=153)	p <sup>a</sup>	OR (95%CI)
<b>CYP1A1 T3801C</b>				
1A/1A	78	80	-	-
1A/2A	22	20	0,697	1,145 (0,579-2,265)
2A/2A	0	0	-	-
*1A	89	90	0,840	
*2A	11	10		
H-W $\chi^2$ (p <sup>b</sup> )	1,15 (0,56)	1,94 (0,38)		
<b>GSTM1</b>				
*plus	45	54	0,202	0,692 (0,393-1,218)
*nulti	55	46		
<b>GSTT1</b>				
*plus	73	73	0,995	1,002 (0,531-1,892)
*nulti	27	27		

Nastavak Tabele 25.

Genotipovi / aleli	HOBP-pacijenti (n=71)	Kontrola (n=153)	p <sup>a</sup>	OR (95%CI)
<b>GSTP1 Ile105Val</b>				
Ile/Ile <sup>1</sup>	55	55	-	-
Ile/Val	41	40	0,905	1,036 (0,579-1,855)
Val/Val	4	5	0,924	0,934 (0,229-3,806)
*Ile	75	75	1,000	
*Val	25	25		
H-W $\chi^2$ (p <sup>b</sup> )	0,70 (0,70)	0,92 (0,63)		
<b>mEPHX Tyr113His</b>				
113Tyr/113Tyr <sup>1</sup>	39,44	50,98	-	-
113Tyr/113His	54,93	43,14	0,095	1,646 (0,916-2,957)
113His/113His	5,63	5,88	0,739	1,238 (0,353-4,341)
*113Tyr	66,90	84,64	0,270	
*113His	33,10	15,36		
H-W $\chi^2$ (p <sup>b</sup> )	4,1 (0,13)	1,05 (0,59)		
<b>mEPHX His139Arg</b>				
139 His/139His <sup>1</sup>	67,61	70,59	-	-
139His/139Arg	30,98	28,10	0,654	1,151 (0,622-2,132)
139Arg/139Arg	1,41	1,31	0,924	1,125(0,100-12,708)
*139His	83,10	84,64	0,780	
*139Arg	16,90	15,36		
H-W $\chi^2$ (p <sup>b</sup> )	0,76 ( 0,69)	1,00 (0,61)		

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; OR(95% CI)-eng. odds ratio (interval pouzdanosti); CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; \*multi-prisustvo delecija GSTM1 ili GSTT1 gena; \*plus-prisustvo intaktnog GSTT1 ili GSTM1 gena; <sup>1</sup> referentna varijabla; <sup>a</sup> razlika između kontrole i HOBP pacijenata; <sup>b</sup> testiranje Hardy-Weinberg-ove ravnoteže; p-statistička značajnost (p<0.05).

#### 4.2.6.1. Analiza složenih genotipova

Hronična opstruktivna bolest pluća je složeno oboljenje u čiju je etiologiju uključeno više faktora koji pokazuju štetne efekte najčešće u interakciji. Značaj pojedinačnih alela i genotipova kao faktora rizika za nastanak HOBP može biti relativno mali u odnosu na kombinacije dva ili tri pojedinačna genotipa.

U ovoj studiji analizirani su složeni genotipovi dobijeni kombinacijama varijanti: mEPH (“fast” i “slow”), GSTM1/GSTT1 i GSTM1/GSTT1/mEPH (“fast” i “slow”) gena. Distribucije složenih genotipova (udruženost dva ili više gena) u

kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata su prikazane u Tabeli 26. Na osnovu enzimске aktivnosti, kombinacije mEPH genotipova (“fast” i “slow”) su klasifikovane u tri fenotipa: sa niskom (His113His/His139His Tyr113His/His139His), srednjom (Tyr113Tyr/His139His, Tyr113His/His139Arg i His113His/Arg139Arg) i visokom (Tyr113Tyr/His139Arg i Tyr113Tyr/Arg139Arg) aktivnošću.

Primenom logističkih regresionih modela, izračunati su “parametric odds ratio” (OR), OR-nekorigovan i OR-korigovan za godine starosti i kumulativno dejstvo duvanskog dima (paklo/godine) (Tabela 26.). Primenom  $\chi^2$ -testa, nije oučena značajna razlika u distribuciji složenih genotipova, koji uključuju sledeće kombinacije gena: mEPH (“fast” i “slow” varijante), GSTM1/GSTT1 i GSTM1/GSTT1/mEPH (“fast” i “slow” varijante), između kontrole i pacijenata ( $p>0,05$ ). Poređenjem učestalosti složenih genotipova, koje su korigovane za godine starosti i paklo/godine, takođe nije uočena statistički značajna razlika između kontrole i pacijenata ( $p>0,05$ ).

Dodatno, ispitane su distribucije složenih genotipova, koji su obuhvatili varijante GSTM1 i GSTT1 gena, u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata, kao i kod muškaraca i žena. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 27. Rezultati analize pokazuju da je kod žena, kombinacija genotipova GSTT1 \*nulti/GSTM1 \*nulti značajno više zastupljena kod pacijentkinja u odnosu na zdrave žene ( $p<0,05$ ; OR, 95% CI: 22,6, 2,6-192,4). Ova analiza je pokazala da žene koje su nosioci genskih varijanti za GSTM1 i GSTT1 koje dovode do delecije ovih gena imaju oko 23 puta veći rizik da obole od HOBP u odnosu na žene koje su nosioci ostalih kombinacija ova dva gena. Međutim, u kontrolnoj grupi, muškarci su imali veću učestalost kombinacije genotipova GSTT1 \*nulti/GSTM1 \*nulti u odnosu na žene ( $p<0,05$ ; OR, 95% CI: 16,7, 2,2-129,4). Na osnovu ovoga zaključujemo, da u zdravoj populaciji muški pol ima skoro 17 puta veći rizik da bude nosilac genskih varijanti za GSTT1 i GSTM1 koje dovode do delecije ovih gena.

**Tabela 26.** Distribucije kombinovanih genotipova (%) za mEPH (“fast” i “slow” varijante) prema aktivnosti, GSTM1 i GSTT1 kod kontrole i pacijenata obolelih od HOBP

Kombinacije genotipova	HOBP (n=71)	Kontrola (n=153)	p	OR*	p	OR**
<b>mEPH aktivnost fenotipa</b>						
<sup>1</sup> niska	44	39	-	-	-	-
srednja	41	42	0,603	0,849 (0,458-1,574)	0,585	1,296 (0,511-3,282)
visoka	15	19	0,435	0,722 (0,318-1,637)	0,507	0,667 (0,202-2,207)
<b>GSTM1/GSTT1</b>						
<sup>1</sup> GSTM1*nulti/GSTT1*nulti	14	12	-	-	-	-
GSTM1*plus /GSTT1*plus	32	39	0,424	0,690 (0,278-1,715)	0,333	0,509 (0,130-1,998)
GSTM1*plus /GSTT1*nulti i GSTM1*nulti/GSTT1*plus	54	49	0,835	0,912 (0,384-2,168)	0,719	1,270 (0,345-4,674)
GSTM1*nulti/GSTT1*nulti vs. svi ostali	14 / 86	12 / 88	0,626	1,230 (0,536-2,820)	0,831	1,144 (0,334-3,915)
GSTM1*plus/GSTT1*plus vs. svi ostali	32 / 68	39 / 61	0,326	0,743 (0,410-1,345)	0,061	0,421 (0,171-1,040)
<b>mEPH aktivnost fenotipa/GSTM1/GSTT1</b>						
mEPH niska/GSTM1*nulti/GSTT1*nulti vs. svi ostali	7 / 93	2 / 98	0,074	3,788 (0,879-16,316)	0,110	7,109 (0,640-79,020)
mEPH visoka/GSTM1*nulti/GSTT1*nulti vs. svi ostali	4 / 96	3 / 97	0,523	1,643 (0,358-7,545)	0,174	0,234 (0,029-1,902)
mEPH niska/GSTM1*plus/GSTT1*plus vs. svi ostali	14 / 86	14 / 86	0,942	1,030 (0,458-2,321)	0,079	0,345 (0,105-1,132)
mEPH visoka/GSTM1*plus/GSTT1*plus vs. svi ostali	6 / 94	9 / 91	0,372	0,593 (0,188-1,870)	0,701	0,742 (0,162-3,394)

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; \*OR (95% CI)-eng. odds ratio (interval pouzdanosti); \*\*OR-prilagođen za godine starosti i paklo-godine; GST-glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; “fast”-varijanta mEPH gena sa povećanom aktivnošću; “slow”-varijanta mEPH gena sa smanjenom aktivnošću; \*nulti-prisustvo delecija GSTM1 ili GSTT1 gena; \*plus-prisustvo intaktnog GSTT1 ili GSTM1 gena; <sup>1</sup> referentna varijabla; p-statistička značajnost (p<0.05).



**Tabela 27.** Distribucije kombinovanih genotipova (%) za GSTM1/GSTT1 gene, u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata obolelih od HOBP, kao i u grupama muškaraca i žena

Kombinacije genotipova	HOBP			Kontrola			Odds ratio	
	Svi (n=71)	M (n=33)	Ž (n=38)	Svi (n=153)	M (n=85)	Ž (n=68)	OR <sup>a</sup> (95% CI)	OR <sup>b</sup> (95% CI)
GSTM1*multi /GSTT1*multi	14	9	18 <sup>a</sup>	12	20 <sup>b</sup>	1	22,6 (2,6-192,4)	16,7 (2,2-129,4)
GSTM1*plus /GSTT1*plus	32	42	24 <sup>a</sup>	39	31 <sup>b</sup>	50	0,4 (0,2-0,9)	0,6 (0,4-0,9)
GSTM1*plus /GSTT1*multi i GSTM1*multi /GSTT1*plus	54	49	58 <sup>a</sup>	49	49	49	3,2 (1,3-7,3)	-

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; M-muškarci; Ž-žene; OR (95% CI)-eng. odds ratio (interval pouzdanosti); OR<sup>a</sup>-u populaciji žena: između kontrole i HOBP-pacijenata; OR<sup>b</sup>-u kontrolnoj grupi: između muškaraca i žena; GST-glutation-S-transferaza; \*multi-prisustvo delecija GSTM1 ili GSTT1 gena; \*plus-prisustvo intaktnog GSTT1 ili GSTM1 gena; <sup>a</sup> razlike između pacijenata i kontrole; <sup>b</sup> razlike između muškaraca i žena; p-statistička značajnost (p<0.05).

#### 4.2.7. Analiza udruženog efekta genetskih i ne-genetskih faktora rizika za nastanak i razvoj HOBP

Etiologija hronične opstruktivne bolesti pluća uključuje genetske i ne-genetske faktore rizika. Smatra se da interakcija ovih faktora može imati veći značaj u patogenezi ove bolesti, u odnosu na pojedinačne faktore rizika. Zbog toga je, u okviru ove studije, ispitan udruženi uticaj genetskih i ne-genetskih faktora rizika na nastanak i razvoj HOBP.

##### 4.2.7.1. Analiza povezanosti pušačkog statusa i ispitivanih genskih varijanti u nastanku HOBP

Analize povezanosti pušačkog statusa i distribucije genotipova u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata prikazani su u Tabeli 28. Ispitane su razlike u

frekvencama genotipova između kontrole i pacijenata u sledećim grupama: pušači, bivši pušači i nepušači.

**Tabela 28.** Distribucija alela i genotipova (%) gena uključenih u metabolizam ksenobiotika u populacijama kontrole i pacijenata, podeljenih prema pušačkom statusu

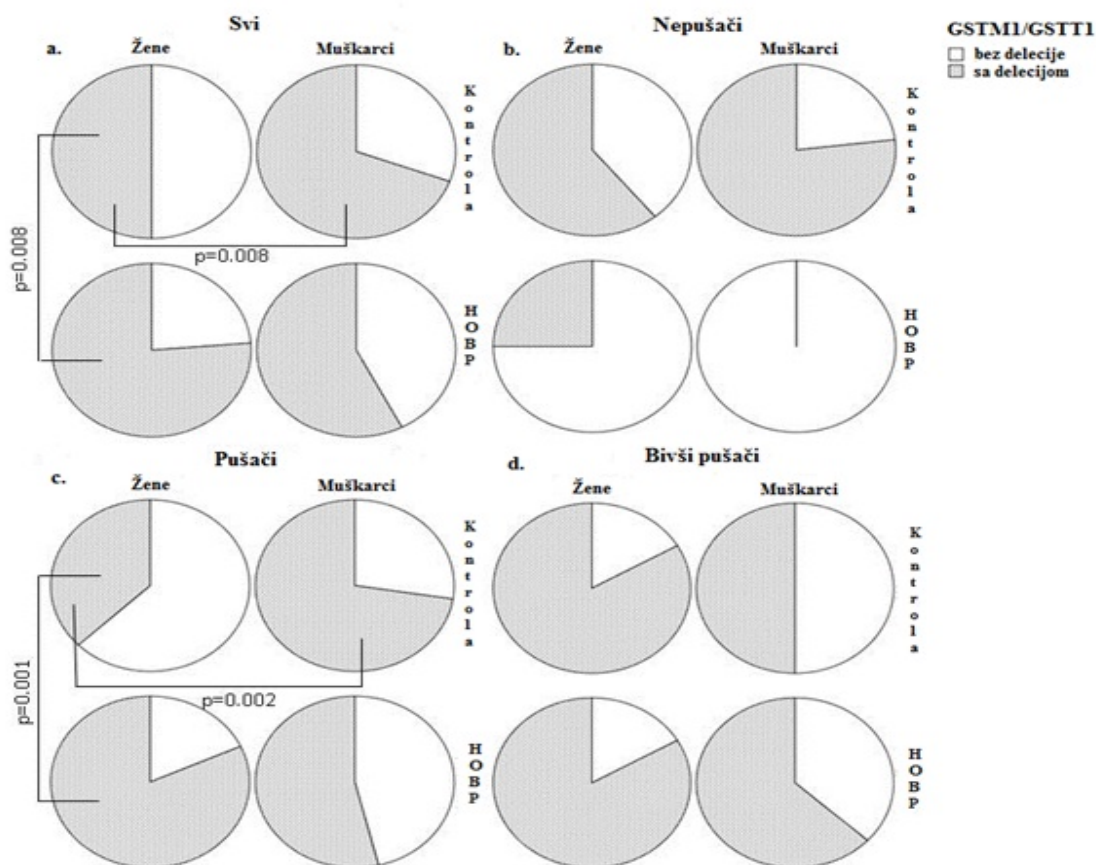
Genotipovi / aleli	HOBP (n=71)			Kontrola (n=153)		
	Pušači (n=35)	Nepušači (n=5)	Bivši pušači (n=31)	Pušači (n=78)	Nepušači (n=50)	Bivši pušači (n=25)
<b>CYP1A1 T3801C</b>						
1A/1A	78	80	77	79	84	71
1A/2A	22	20	23	21	16	29
2A/2A	0	0	0	0	0	0
<b>GSTM1</b>						
*plus	37 <sup>a</sup>	80	48	57	47	63
*nulti	63	20	52	43	53	37
<b>GSTT1</b>						
*plus	77	100	65	71	74	75
*nulti	23	0	35	29	26	25
<b>GSTP1 Ile105Val</b>						
Ile/Ile	51	80	55	59	51	54
Ile/Val	46	20	39	35	49	42
Val/Val	3	0	6	6	0	4
<b>mEPHX1Tyr113His</b>						
113Tyr/113Tyr	37	60	39	53	55	42
113Tyr/113His	54	40	58	41	43	46
113His/113His	9	0	3	5	2	12
<b>mEPHX1His139Arg</b>						
139 His/139His	66	80	68	67	74	75
139His/139Arg	31	20	32	33	22	25
139Arg/139Arg	3	0	0	0	4	0

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; CYP-eng. Cytochrome; GST-glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; \*nulti-prisustvo delecija GSTM1 ili GSTT1 gena; \*plus-prisustvo intaktnog GSTT1 ili GSTM1 gena; <sup>a</sup>razlika između kontrole i HOBP pacijenata; p-statistička značajnost (p<0.05).

Analiza distribucije genotipova prema pušačkom statusu je pokazala da je prisustvo GSTM1 \*nultog genotipa povezano sa dva puta većim rizikom za razvoj HOBP nego prisustvo GSTM1 \*plus genotipa, u populaciji pušača (p<0,05; OR, 95% CI: 2,27, 1,00-5,19).

#### 4.2.7.2. Analiza udruženog uticaja pola, pušačkog statusa i složenog GSTM1/GSTT1 genotipa na nastanak HOBP

Razlike u distribuciji složenih GSTM1/GSTT1 genotipova između pacijenata i kontrole su ispitane u čitavoj populaciji, kao i u različitim grupama ispitanika koje su podeljene prema polu i pušačkom statusu (Slika 21.).



**Slika 21.** Distribucija složenog GSTM1/GSTT1 genotipa (sa najmanje jednom delecijom i bez delecije): a. u celoj HOBP i kontrolnoj grupi; b. kod nepušača: u kontrolnoj i HOBP grupi; c. kod pušača: u kontrolnoj i HOBP grupi; d. kod bivših pušača: u kontrolnoj i HOBP grupi.

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; GST-glutation-S-transferaza.

Rezultati analize su pokazali da složeni genotip koji ima najmanje jednu deleciju GSTM1/GSTT1 gena (GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti, GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*plus, GSTM1 \*plus/GSTT1 \*nulti) kod žena predstavlja rizik za razvoj HOBP ( $p=0,008$ ; OR,

95% CI: 3,22, 1,32-7,82) (Slika 21a.). Analizom u različitim pušačkim grupama je otkriveno da ove kombinacije udruženih genotipova predstavljaju mnogo veći rizik od razvoja HOBP kod žena koje su aktivni pušači ( $p=0,001$ ; OR, 95% CI: 7,61, 2,11-27,44) (Slika 21c.), odnosno žene pušači koje su nosioci nulte varijante jednog ili oba gena za GSTM1/GSTT1 imaju više od sedam puta veći rizik da obole od HOBP.

Učestalost složenog genotipa sa bar jednom delecijom GSTM1/GSTT1 gena, kod zdravih žena je značajno niža u odnosu na muškarce ( $p=0,008$ ; OR, 95% CI: 0,31, 0,13-0,75) (Slika 21a). Ove razlike su prisutne između žena i muškaraca u populaciji zdravih pušača ( $p=0,002$ ; OR, 95% CI: 0,22, 0,08-0,60) (Slika 21c.).

Kod pacijenata razlike između muškaraca i žena u distribuciji ovih složenih genotipova nisu bile statistički značajne. Kod žena je kombinacija GSTM1/GSTT1 gena sa bar jednom delecijom bila više zastupljena, ali ove razlike nisu bile statistički značajne ( $p>0,05$ ) (Slika 21a.).

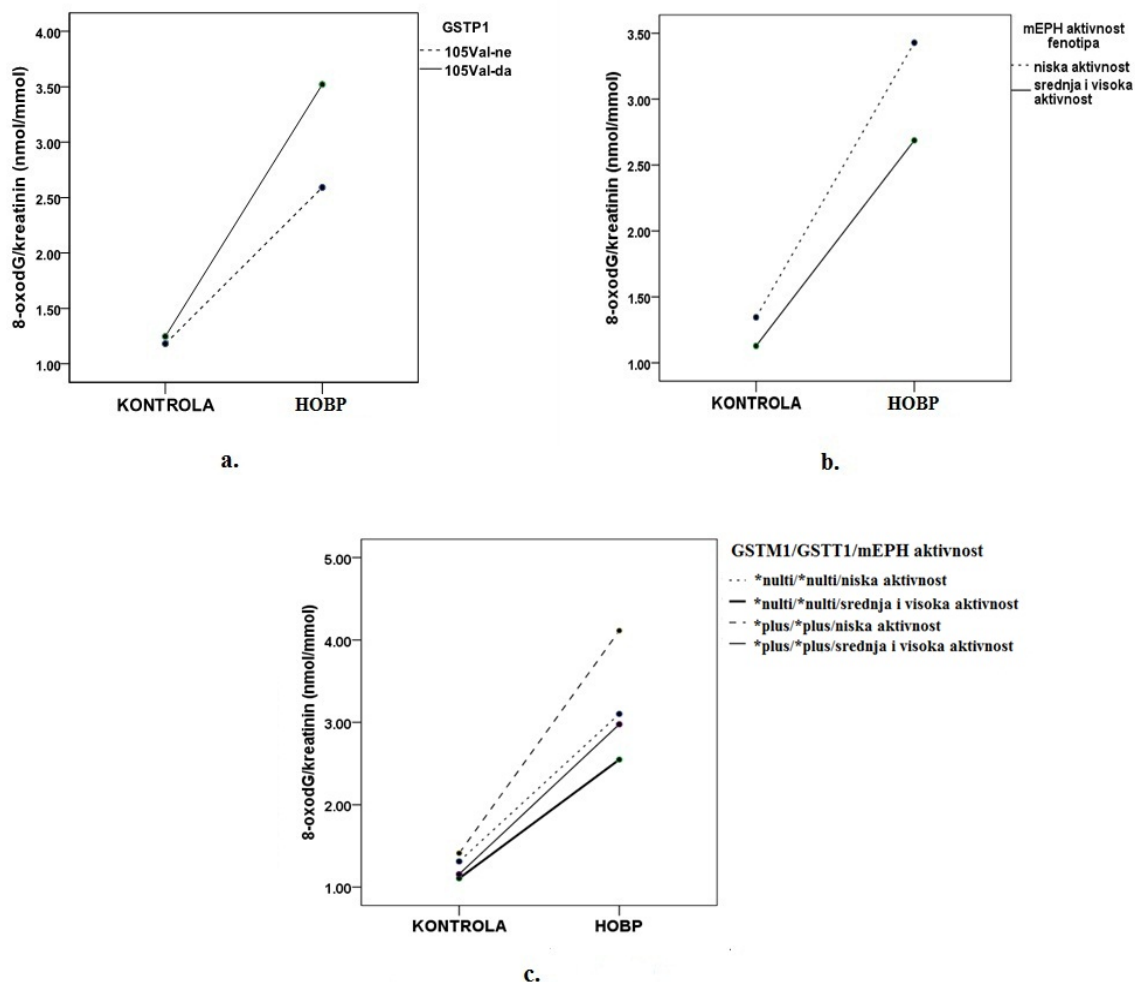
U populacijama nepušača (Slika 21b.) i bivših pušača (Slika 21d.) nije primećena značajna razlika u distribucijama ovih složenih genotipova ( $p>0,05$ ), kako između pacijenata i kontrole, tako i između polova.

#### **4.2.7.3. Analiza uticaja genskih varijanti GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPH gena na nivo oksidativnog stresa kao faktora rizika za pojavu HOBP**

U okviru studije analiziran je uticaj varijanti GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPH gena na nivo oksidativnog stresa (procenjen na osnovu 8-oxodG/kreatinina) kod kontrole i HOBP-pacijenata (Slika 22. i Tabela 29.)

Primenom testa, dvo-faktorska ANOVA metod (two-way ANOVA), utvrđeno je da na nivo 8-oxodG/kreatinina utiče prisustvo bolesti ( $p<0,001$ ; eta kvadrat=0,335), prisustvo GSTP1 varijante gena ( $p=0,005$ ; eta kvadrat=0,035), kao i interakcija ovih nezavisnih faktora ( $p=0,015$ ; eta kvadrat=0,027) (Tabela 29.). Primenom Šidak testa, analiziran je uticaj GSTP1 genske varijante kod kontrole i HOBP-pacijenata (Slika 22a.). Pacijenti su imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u odnosu na zdrave u obe ispitivane grupe podeljene prema odsustvu ili prisustvu GSTP1 alela 105Val (za GSTP1 105Val-ne:  $p<0,001$ ; eta kvadrat=0,141; GSTP1 105Val-da:  $p<0,001$ ; eta kvadrat=0,259) (Slika 22a.). Uticaj genske varijante GSTP1 gena na nivo 8-oxodG/kreatinina je bio

značajan u grupi HOBP-pacijenata ( $p=0,002$ ; eta kvadrat=0,045). HOBP-pacijenti, nosioci GSTP 105Val alela su imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u odnosu na pacijente koji nisu nosioci ovog alela ( $3,52\pm 2,54$  vs  $2,59\pm 1,32$ ;  $p=0,002$ ) (Slika 22a).



**Slika 22.** Aritmetičke srednje vrednosti 8-oxodG/kreatinina kod zdravih i HOBP-pacijenata na osnovu genskih varijanti; **a.** GSTP1; **b.** mEPH enzimska aktivnost; **c.** kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost.

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; GST-glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; \*multi-prisustvo delecija GSTM1 ili GSTT1 gena; \*plus-prisustvo intaktnog GSTT1 ili GSTM1 gena.

**Tabela 29.** Testiranje uticaja, veličine uticaja individualnih faktora (zdravstveno stanje i genske varijante) i njihovih interakcija na nivo 8-oxodG/kreatinina

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	P	Eta kvadrat
8-oxodG/kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<0,001	0,335
	GSTP varijanta (105Val-da/105Val-ne)	0,005	0,035
	Stanje*GSTP varijanta	0,015	0,027
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje: GSTP 105Val-ne	<0,001	0,141
	Stanje: GSTP 105Val-da	<0,001	0,259
	GSTP varijanta: kontrola	0,743	<0,001
	GSTP varijanta: HOBP	0,002	0,045
8-oxodG/kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<0,001	0,323
	mEPH aktivnost (niska/srednja i visoka)	0,008	0,032
	Stanje*mEPH aktivnost	0,143	0,010
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje: mEPH niska aktivnost	<0,001	0,212
	Stanje: mEPH srednja i visoka aktivnost	<0,001	0,173
	mEPH aktivnost: kontrola	0,290	0,005
mEPH aktivnost: HOBP	0,012	0,029	
8-oxodG/kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje (kontrola/HOBP)	<0,001	0,331
	Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost (GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH niska aktivnost; GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH srednja i visoka aktivnost; GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH niska aktivnost; GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH srednja i visoka aktivnost)	0,009	0,052
	Stanje* kombinacija GSTM/GSTT1/mEPH aktivnost	0,164	0,024
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje: GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH niska aktivnost	<0,001	0,121
	Stanje: GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH srednja i visoka aktivnost	<0,001	0,105
	Stanje: GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH niska aktivnost	<0,001	0,131
	Stanje: GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH srednja i visoka aktivnost	<0,001	0,092
	Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost: kontrola	0,739	0,006
Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost: HOBP	0,008	0,054	

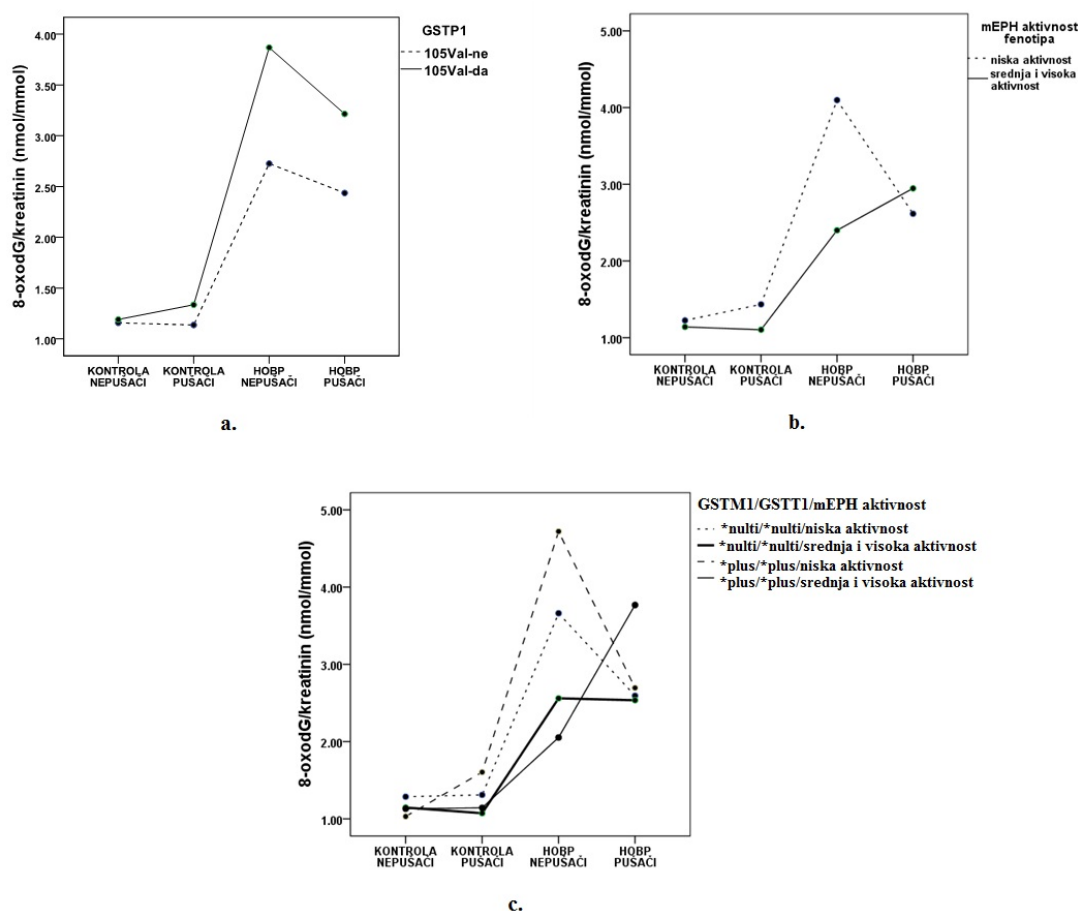
HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; GST-glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida.

Statističkom analizom je pokazano da na nivo 8-oxodG/kreatinina utiče prisustvo bolesti ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,323), mEPH enzimski aktivnost ( $p = 0,008$ ; eta kvadrat=0,032), dok interakcija ovih nezavisnih faktora nema značajnog uticaja ( $p = 0,143$ ; eta kvadrat=0,010) (Tabela 29.). Daljom analizom, primenom Šidak testa, analiziran je uticaj različite enzimski aktivnosti u grupama zdravih i HOBP-pacijenata (Slika 22b.). Pacijenti su imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina bez obzira na mEPH enzimski aktivnost (mEPH niska aktivnost:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,212; mEPH srednja i visoka aktivnost:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,173). Međutim, uticaj mEPH enzimski aktivnosti na nivo 8-oxodG/kreatinina je bio značajan u grupi HOBP-pacijenata ( $p = 0,012$ ; eta kvadrat=0,029) (Slika 22b.). Pacijenti sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću su imali značajno viši nivo 8-oxodG/kreatinina u odnosu na pacijente sa srednjom i visokom mEPH aktivnošću ( $3,43 \pm 2,23$  vs  $2,69 \pm 1,78$ ;  $p = 0,012$ ) (Slika 22b.).

Daljom analizom utvrđeno je da na nivo 8-oxodG/kreatinina utiče prisustvo bolesti ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,331), kombinacije genskih varijanti GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost ( $p = 0,009$ ; eta kvadrat=0,052), dok interakcija ovih nezavisnih faktora nema značajnog uticaja ( $p = 0,164$ ; eta kvadrat=0,024) (Tabela 29.). Primenom Šidak testa, pokazano je da su pacijenti imali viši nivo 8-oxodG/kreatinina u odnosu na zdrave, bez obzira na kombinacije genskih varijanti (GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti/ mEPH niska aktivnost:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,121; GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti/mEPH srednja i visoka aktivnost:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,105); GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska aktivnost:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,131; GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH srednja i visoka aktivnost:  $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,092) (Slika 22c.). Značajan uticaj kombinacija genotipova na nivo 8-oxodG/kreatinina primećen je kod HOBP-pacijenata ( $p = 0,008$ ; eta kvadrat=0,054). Pacijenti, nosioci genotipa GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska aktivnost su imali značajno više nivoe 8-oxodG/kreatinina u odnosu na nosioce kombinacije GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti/ mEPH srednja i visoka aktivnost ( $4,11 \pm 2,88$  vs  $2,55 \pm 1,74$ ;  $p = 0,004$ ) (Slika 22c.).

#### 4.2.7.4. Analiza uticaja genskih varijanti GSTM1, GSTT1, GSTP1, mEPH gena i pušenja na nivo oksidativnog stresa kao faktora rizika za pojavu HOBP

Analiziran je uticaj genskih varijanti GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPH gena i pušenja na nivo oksidativnog stresa (procenjen na osnovu 8-oxodG/kreatinina) kod zdravih i HOBP-pacijenata (Slika 23).



**Slika 23.** Aritmetičke srednje vrednosti 8-oxodG/kreatinina kod zdravih i HOBP-pacijenata na osnovu pušačkog statusa i genskih varijanti; **a.** GSTP1; **b.** mEPH enzimska aktivnost; **c.** kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost.

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; GST-glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; \*multi-prisustvo delecija GSTM1 ili GSTT1 gena; \*plus-prisustvo intaktnog GSTT1 ili GSTM1 gena.



**Tabela 30.** Testiranje uticaja, veličine uticaja individualnih faktora (zdravstveno stanje, genske varijante i pušenje) i njihovih interakcija na nivo 8-oxodG/kreatinina

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
8-oxodG/ kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje*pušenje (kontrola-nepušači/kontrola-pušači/ HOBP-nepušači/HOBP-pušači)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,346</b>
	GSTP varijanta(105Val-da/105Val-ne)	<b>0,003</b>	<b>0,042</b>
	Stanje*pušenje*GSTP varijanta	0,108	0,029
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje*pušenje: GSTP 105Val-ne	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,151</b>
	Stanje*pušenje: GSTP 105Val-da	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,267</b>
	GSTP varijanta: kontrola-nepušači	0,901	<0,001
	GSTP varijanta: kontrola-pušači	0,490	0,002
	GSTP varijanta: HOBP-nepušači	<b>0,006</b>	<b>0,035</b>
	GSTP varijanta: HOBP-pušači	0,062	0,017
8-oxodG/ kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje*pušenje (kontrola-nepušači/kontrola-pušači/ HOBP-nepušači/HOBP-pušači)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,336</b>
	mEPH aktivnost (niska/srednja i visoka)	<b>0,013</b>	<b>0,029</b>
	Stanje*pušenje*mEPH aktivnost	<b>0,003</b>	<b>0,066</b>
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje*pušenje: mEPH niska aktivnost	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,258</b>
	Stanje*pušenje: mEPH srednja i visoka aktivnost	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,191</b>
	mEPH aktivnost: kontrola-nepušači	0,770	<0,001
	mEPH aktivnost: kontrola-pušači	0,260	0,006
	mEPH aktivnost: HOBP-nepušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,079</b>
	mEPH aktivnost: HOBP-pušači	0,426	0,003
8-oxodG/ kreatinin	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Stanje*pušenje (kontrola-nepušači/kontrola-pušači/ HOBP-nepušači/HOBP-pušači)	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,328</b>
	Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPHaktivnost (GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH niska aktivnost/ GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH srednja i visoka aktivnost; GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH niska aktivnost/ GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH srednja i visoka aktivnost)	0,083	0,033
	Stanje*pušenje*kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost	<b>0,012</b>	<b>0,099</b>
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Stanje*pušenje: GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH niska aktivnost	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,147</b>
	Stanje*pušenje: GSTM1*nulti/GSTT1*nulti/mEPH srednja i visoka aktivnost	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,114</b>
	Stanje*pušenje: GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH niska aktivnost	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,167</b>
	Stanje*pušenje: GSTM1*plus/GSTT1*plus/mEPH srednja i visoka aktivnost	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,128</b>
	Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost: kontrola-nepušači	0,954	0,002
	Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost: kontrola-pušači	0,636	0,008
Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost: HOBP-nepušači	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,098</b>	
Kombinacija GSTM1/GSTT1/mEPH aktivnost: HOBP-pušači	0,137	0,027	

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; GST-glutation-S-transferaza; mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; \*nulti-prisustvo delecija GSTM1 ili GSTT1 gena; \*plus-prisustvo intaktnog GSTT1 ili GSTM1 gena; p-statistička značajnost (p<0,05).

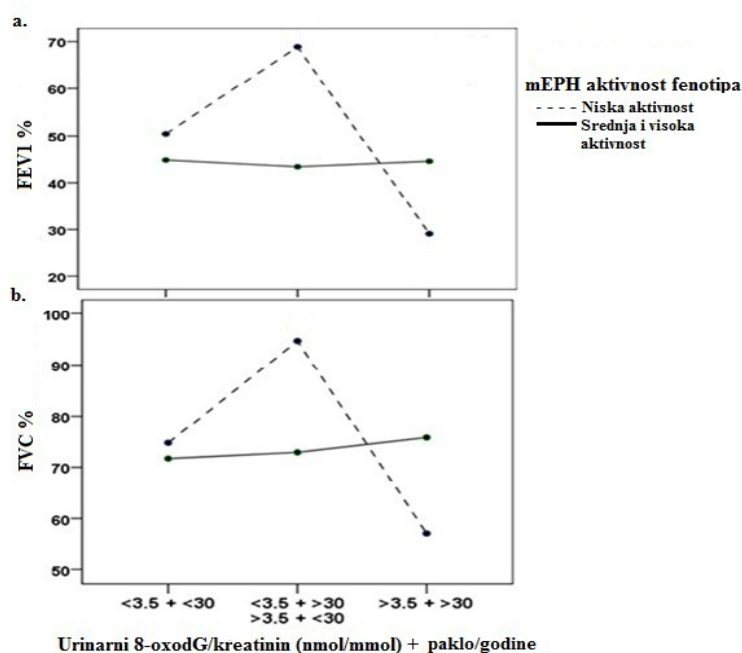
Primenom testa, dvo-faktorska ANOVA (two-way ANOVA), utvrđeno je da na nivo 8-oxodG/kreatinina utiče varijanta GSTP1 gena ( $p=0,003$ ; eta kvadrat= $0,042$ ), interakcija prisustva bolesti i pušenja ( $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,346$ ), dok interakcije svih ovih faktora nisu imale uticaja ( $p=0,108$ ; eta kvadrat= $0,029$ ) (Tabela 30.). Daljom analizom, primenom Šidak testa, utvrđen je viši nivo 8-oxodG/kreatinina kod pacijenata u odnosu na zdrave, bez obzira na pušački status i prisustvo GSTP1 varijante (GSTP 105Val-ne:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,151$ ; GSTP 105Val-da:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,267$ ) (Slika 23a.). Prisustvo GSTP 105Val alela značajno utiče na nivo 8-oxodG/kreatinina u grupi pacijenata-nepušača ( $p=0,006$ ; eta kvadrat= $0,035$ ) (Slika 23a.). Pacijenti-nepušači, nosioci GSTP 105Val alela, su imali viši nivo 8-oxodG/kreatinina u odnosu na one kod kojih ovaj alel nije prisutan ( $3,87\pm 2,73$  vs  $2,73\pm 1,46$ ;  $p=0,006$ ) (Slika 23a.).

Analizom dobijenih rezultata, utvrđeno je da na nivo 8-oxodG/kreatinina utiče mEPH enzimsko aktivnost ( $p=0,013$ ; eta kvadrat= $0,029$ ), interakcija pušenja i prisustvo bolesti ( $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,336$ ), kao i interakcije sva tri navedena faktora ( $p=0,003$ ; eta kvadrat= $0,066$ ) (Tabela 30.). Upotrebom Šidak testa, utvrđen je viši nivo 8-oxodG/kreatinina kod pacijenata u odnosu na kontrolu, bez obzira na pušački status i mEPH enzimsku aktivnost (niska mEPH enzimsko aktivnost:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,258$ ; srednja i visoka mEPH enzimsko aktivnost:  $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,191$ ) (Slika 23b.). Različita mEPH enzimsko aktivnost je uticala na nivo 8-oxodG/kreatinina u populaciji pacijenata-nepušača ( $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,079$ ). Kod nosilaca fenotipa sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću primećen je viši nivo 8-oxodG/kreatinina u odnosu na one sa srednjom i visokom mEPH aktivnošću ( $4,10\pm 2,54$  vs  $2,40\pm 1,26$ ;  $p<0,001$ ) (Slika 23b.).

Statističkom analizom utvrđeno je da na nivo 8-oxodG/kreatinina utiče interakcija prisustva bolesti i pušenje ( $p<0,001$ ; eta kvadrat= $0,328$ ), kao i interakcija ova dva faktora sa kombinacijom GSTM1/GSTT1/mEPH genotipova ( $p=0,012$ ; eta kvadrat= $0,099$ ) (Tabela 30.). U svim analiziranim grupama, sa različitim kombinacijama GSTM1/GSTT1/mEPH genotipova, pacijenti su imali viši nivo 8-oxodG/kreatinina u odnosu na zdrave ispitanike ( $p<0,001$ ) (Slika 23c.). Interesantno, najviši nivo 8-oxodG/kreatinina primećen je kod pacijenata-nepušača koji su nosioci kombinovanog genotipa GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska aktivnost (Slika 23c.). U grupi nepušača, pacijenti sa složenim genotipom GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska aktivnost su imali više vrednosti 8-oxodG/kreatinina u odnosu na nosioce GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti/mEPH srednja i visoka aktivnost i nosioce GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH srednja i visoka aktivnost ( $4,72\pm 3,02$  vs  $2,56\pm 1,42$  vs  $2,05\pm 0,82$ ) (Slika 23c.).

#### 4.2.7.5. Analiza udruženog uticaja pušenja, oksidativnog stresa i aktivnosti mEPH fenotipova na parametre plućne funkcije

Primenom testa, dvo-faktorska ANOVA (dvo-faktorska analiza varijanse između grupa) ispitana je povezanost između visokog nivoa oksidativnog stresa, teškog pušenja, aktivnosti mEPH fenotipova (niska vs. srednja i visoka aktivnost) i plućne funkcije kod pacijenata obolelih od HOBP. Za analizu udruženog uticaja pušenja, oksidativnog stresa i različitih aktivnosti mEPH fenotipova, pacijenti sa HOBP su podeljeni u grupe prema aktivnostima mEPH fenotipova, težini pušenja (procenjena na osnovu paklo-godine) i nivoa oksidativnog stresa (procenjen na osnovu nivoa urinarnog 8-oxodG/kreatinina) (Slika 24.). Plućna funkcija je procenjena na osnovu spirometrijskih parametara: FEV1, % od predviđenih vrednosti i FVC,% od predviđenih vrednosti. Visok nivo oksidativnog stresa je procenjen na osnovu vrednosti  $\geq 98$ . percentila za 8-oxodG/kreatinin u kontrolnoj grupi i ova vrednost je iznosila 3,5 nmol/mmol. Teški pušači su bili ispitanici sa istorijom pušenja preko 30 paklo/godine.



**Slika 24.** Udruženi uticaj povišenog oksidativnog stresa (urinarni 8-oxodG/kreatinin > 3,5 nmol/mmol), teškog pušenja (paklo/godine > 30) i aktivnosti mEPH fenotipova (niska, srednja i visoka aktivnost) na plućnu funkciju, procenjenu na osnovu: a. FEV1% forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); b. FVC% forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti).

mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin.

Rezultati testiranja uticaja povišenog oksidativnog stresa, teškog pušenja i aktivnosti mEPH fenotipova, kao i interakcije ovih nezavisnih promenljivih na nivoe parametara plućne funkcije prikazani su u Tabeli 31.

**Tabela 31.** Testiranje uticaja, veličine uticaja individualnih faktora (povišenog oksidativnog stresa, teškog pušenja i aktivnosti mEPH fenotipa) i njihovih interakcija na nivoe parametara plućne funkcije

Zavisna promenljiva	Uticaji faktora i njihove interakcije	p	Eta kvadrat
FEV1, %	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Aktivnost mEPH fenotipa (niska/srednja i visoka)	0,305	0,018
	Pušenje+oks.stres (<30+ <3,5 / <30+>3,5 i >30+<3,5 / >30+>3,5)	<b>0,005</b>	<b>0,163</b>
	Aktivnost mEPH fenotipa* pušenje+oks.stres	<b>0,011</b>	<b>0,142</b>
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Aktivnost mEPH fenotipa: pušenje+oks.stres (<30+<3,5)	0,657	0,003
	Aktivnost mEPH fenotipa: pušenje+oks.stres (<30+>3,5 i >30+<3,5)	<b>0,001</b>	<b>0,159</b>
	Aktivnost mEPH fenotipa: pušenje+oks.stres (>30+>3,5)	0,206	0,027
	Pušenje+oks.stres: niska mEPH aktivnost	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,281</b>
	Pušenje+oks.stres: srednja i visoka mEPH aktivnost	0,854	0,005
FVC, %	<b>Pojedinačni uticaji i interakcije</b>		
	Aktivnost mEPH fenotipa (niska/srednja i visoka)	0,672	0,003
	Pušenje+oks.stres (<30+<3,5 / <30+>3,5 i >30+<3,5 / >30+>3,5)	<b>0,009</b>	<b>0,147</b>
	Aktivnost mEPH fenotipa* pušenje+oks.stres	0,083	0,081
	<b>Post Hoc analiza po Šidak-u</b>		
	Aktivnost mEPH fenotipa: pušenje+oks.stres (<30+<3,5)	0,769	0,001
	Aktivnost mEPH fenotipa: pušenje+oks.stres (<30+>3,5 i >30+<3,5)	<b>0,027</b>	<b>0,080</b>
	Aktivnost mEPH fenotipa: pušenje+oks.stres (>30+>3,5)	0,409	0,012
	Pušenje+oks.stres: niska mEPH aktivnost	<b>0,001</b>	0,206
Pušenje+oks.stres: srednja i visoka mEPH aktivnost	0,726	0,011	

8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; BMI-indeks telesne mase; FEV1%-forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (% od predviđenih vrednosti); FVC%-forsirani vitalni kapacitet (% od predviđenih vrednosti); mEPH-mikrozomalna hidrolaza epoksida; p-statistička značajnost (p<0,05).

Statističkom analizom je utvrđeno da oksidativni stres i pušenje imaju veliki uticaj na smanjenje FEV1 (p=0,005; eta kvadrat=0,163), kao i interakcija ovih faktora sa različitim fenotipskim aktivnostima mEPH enzima (p=0,011; eta kvadrat=0,142) (Tabela 31.). Daljom analizom, korišćenjem Šidak testa, utvrđen je najveći pad plućne

funkcije kod teških pušača (paklo/godine >30), sa niskom enzimskom aktivnošću mEPH i povišenim oksidativnom stresom (urinarni 8-oxodG/kreatinin >3,5 nmol/mmol) ( $p < 0,001$ ; eta kvadrat=0,281). Pacijenti sa niskom enzimskom aktivnošću mEPH, koji su teški pušači i sa visokim nivoima oksidativnog stresa, imaju značajno niže vrednosti parametra plućne funkcije FEV1 u odnosu na pacijente koji nisu teški pušači i sa nižim oksidativnim stresom, kao i na pacijente koji imaju kombinaciju ova dva faktora rizika ( $29,11 \pm 5,74$  vs  $50,4 \pm 6,3$ ,  $p = 0,042$ ;  $29,11 \pm 5,74$  vs.  $68,9 \pm 6,7$ ,  $p = 0,001$ ) (Slika 24a.).

Kod pacijenata sa srednjom i visokom mEPH enzimskom aktivnošću, nije primećen značajan uticaj povišenog oksidativnog stresa i teškog pušenja na smanjenje FEV1 ( $p > 0,05$ ) (Tabela 31.).

Primenom testa dvo-faktorska ANOVA, utvrđen je veliki uticaj oksidativnog stresa i pušenja na nivo FVC ( $p = 0,009$ ; eta kvadrat=0,147), dok fenotipska aktivnost mEPH enzima i interakcija ovih faktora nemaju značajan uticaj ( $p > 0,05$ ), mada je verovatnoća bila na granici značajnosti ( $p = 0,083$ ) (Tabela 31.). Primenom Šidak testa, u grupi pacijenata sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću, primećen je značajno niži nivo FVC kod ispitanika sa povišenim oksidativnim stresom i teškim pušenjem u odnosu na ispitanike koji imaju u kombinaciji jedan od ova dva faktora rizika ( $57,11 \pm 6,82$  vs.  $93,5 \pm 6,47$ ,  $p = 0,001$ ) (Slika 24b.).

Takođe, u grupi pacijenata sa srednjom i visokom mEPH enzimskom aktivnošću, nije primećen značajan uticaj povišenog oksidativnog stresa i teškog pušenja na smanjenje FVC ( $p > 0,05$ ) (Tabela 31.).

#### **4.2.7.6. Analiza prediktora za nastanak HOBP**

Binarnom logističkom regresijom (metodom unosa, eng. enter) identifikovani su genetski i ne-genetski prediktori za nastanak HOBP, u celoj populaciji pacijenata sa HOBP i kod pacijenata različitog pola (Tabela 32.). U svim ispitivanim populacijama, model logističke regresije je objasnio između 57,6% (Cox and Snell R square) i 78,6% (Nagelkerke R squared) varijanse u razvoju HOBP i pravilno klasifikovao 88,9% pacijenata sa HOBP. Osetljivost regresionog modela je iznosila 95,7% kod muškaraca i 86,9% kod žena.

Statistička analiza je pokazala da povišeni leukociti, 8-oxodG/kreatinin, godine starosti, intenzitet pušenja (paklo/godine) kao i prisustvo najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu predstavljaju nezavisne prediktore za nastanak HOBP u celoj populaciji ( $p < 0,05$ ). Kod oba pola, povišeni nivoi leukocita i 8-oxodG/kreatinina predstavljaju značajne prediktore za razvoj HOBP ( $p < 0,05$ ). Pored toga, rizik za nastanak HOBP kod muškaraca je povezan sa starošću, dok je kod žena povezan sa povišenim intenzitetom pušenja i prisustvom najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 32.** Binarni model logističke regresije za predviđanje razvoja HOBP u celoj populaciji, kao i u populaciji muškaraca i žena

Prediktori	Svi			Muškarci			Žene		
	$\beta$ (S.E)	p	OR (95% CI)	$\beta$ (S.E)	p	OR (95% CI)	$\beta$ (S.E)	p	OR (95% CI)
Starost, godine	0,18 (0,05)	<0,001	1,19 (1,1-1,3)	0,25 (0,07)	<0,001	1,29 (1,12-1,48)	-	-	-
Paklo/godine	0,04 (0,02)	0,04	1,04 (1,00-1,08)	-	-	-	0,08 (0,04)	0,02	1,09 (1,01-1,16)
8-oxodG/kreatinin (nmol/mmol)	1,36 (0,38)	<0,001	3,91 (1,83-8,34)	2,13 (0,67)	0,001	8,42 (2,26-31,28)	1,28 (0,53)	0,01	3,60 (1,37-9,45)
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	0,57 (0,15)	<0,001	1,77 (1,33-2,37)	0,58 (0,19)	0,003	1,75 (1,21-2,62)	0,39 (0,15)	0,01	1,47 (1,10-1,98)
GSTM1/GSTT1 sa delecijom	1,782 (0,79)	0,02	5,94 (1,27-27,91)	-	-	-	3,17 (1,12)	0,01	23,67 (2,62-213,46)
Konstanta	-19,05 (4,02)	<0,001	-	- 22,47 (5,31)	<0,001	-	- 10,38 (2,66)	<0,001	-
Celokupan model	$\chi^2$ (df 3, N = 183) = 131,4, p < 0,001			$\chi^2$ (df 3, N = 116) = 101,4, p < 0,001			$\chi^2$ (df 4, N = 67) = 49,28, p < 0,001		

HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća;  $\beta$  (S.E): regresioni koeficijent  $\beta$  (standardna greška za  $\beta$ ); OR (95% CI): eng. odds ratio (interval pouzdanosti); 8-oxodG-8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin; GST-glutation-S-transferaza; p-statistička značajnost (p<0.05).

## 5. DISKUSIJA

I pored intenzivnih istraživanja, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi nastanka i razvoja hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP) nisu još uvek dovoljno razjašnjeni. Takođe, nedovoljno su istražene interakcije između genetskih, sredinskih i drugih faktora rizika u nastanku oksidativnog stresa, koji je uključen u patogenezu hronične opstruktivne bolesti pluća. Stoga, cilj ovog istraživanja je da se ispita uloga genetskih i ne-genetskih faktora rizika, kao i njihovih interakcija u patogenezi nastanka i razvoja HOBP-a u populaciji Srbije.

### 5.1. Analiza uticaja oksidativnog stresa i izloženosti duvanskom dimu u nastanku i razvoju HOBP-a

Hronična opstruktivna bolest pluća je multifaktorska bolest koju karakteriše ograničen protok vazduha kroz disajne puteve koji nije potpuno reverzibilan. Ovo ograničenje protoka je obično progresivno i povezano sa sistemskom i lokalnom inflamacijom i oksidativnim stresom (7). Zahvaljujući svom enzimskom i neenzimskom antioksidativnom odbrambenom sistemu, pluća su sposobna da metabolišu veći broj toksičnih supstanci (22). Međutim, pluća su veoma osetljiva na oštećenja izazvana endogenim i egzogenim oksidansima. Smatra se da, pro-oksidansi iz duvanskog dima imaju najveći uticaj na oštećenje funkcije pluća. Ravnoteža između pro-oksidanasa endogenog/egzogenog porekla i antioksidativnog odbrambenog sistema organizma je kritična za održavanje normalne funkcije pluća. Povišen oksidativni stres kod HOBP-pacijenata nastaje usled povećane izloženosti štetnim inhalacionim česticama i povećanja slobodnih kiseoničnih radikala koje proizvode inflamatorne ćelije (neutrofil i makrofage). Slobodni kiseonični radikali dovode do direktnog oštećenja proteina, lipida i DNK što posledično dovodi do smanjenja lumena disajnih puteva i razvoja HOBP (8).

Merenjem ukupnog oksidativnog statusa (Total Oxidation Status, TOS) i ukupnog antioksidativnog kapaciteta (Total Antioxidant Capacity, TAC) (49, 50), kao i izračunavanjem oksidativnog indeksa (OSI) (51), dobija se jasan uvid u red-oks status organizma i upotpunjuje se profil fizioloških i patofizioloških mehanizama.



Povećanjem toksičnih oksidanasa ili smanjenjem antioksidativne zaštite može se narušiti red-oks ravnoteža i nastati oksidativni stres. Oksidativni stres ima ključnu ulogu u patogenezi HOBP-a (131, 132, 133). Dokazano je da kod pacijenata sa HOBP sa povećanjem nivoa oksidanasa, antioksidativna zaštita opada (52). Ranija studija, sprovedena u populaciji Srbije, pokazala je značajno viši nivo oksidativnog stresa kod HOBP-pacijenata (134). Takođe, u studijama sprovedenim u Egiptu i Indiji primećen je niži nivo serumskog TAC kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolne ispitanike (55, 56).

U našoj studiji, utvrđen je značajno povišen nivo oksidativnog stresa (procenjen na osnovu TOS i OSI) kod HOBP-pacijenata (Tabela 8.). Povišen oksidativni indeks (OSI), kao parametar koji ukazuje na odnos ukupnog oksidativnog i antioksidativnog kapaciteta je potvrda narušene ravnoteže između pro-oksidanasa i antioksidativne zaštite kod HOBP-pacijenata. Nivo ukupnog antioksidativnog statusa, koji uključuje neenzimske antioksidanse u krvi, nije se razlikovao između pacijenata i kontrole (Tabela 8.). Dobijeni visok nivo oksidativnog stresa (TOS i OSI), uz normalan nivo antioksidativne zaštite (TAC) kod HOBP-pacijenata, u skladu je sa rezultatima studija sprovedenih u Turskoj i Kini (53, 54). Ovakvi rezultati ukazuju na činjenicu da kod HOBP-pacijenata, iako očuvan, antioksidativni sistem zaštite nije dovoljan da neutrališe prekomernu produkciju toksičnih pro-oksidanasa.

Drugi deo naše studije bavio se sistemskim efektom oksidativnog stresa na pojavu i razvoj HOBP. Poznato je da povišen oksidativni stres u ćelijama najčešće dovodi do oksidativnog oštećenja DNK, koji pod određenim uslovima prevazilazi složeni mehanizam reparacije DNK. Urinarni biomarker oksidativnog oštećenja DNK, 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxodG) je najviše proučavan i prepoznat kao najbolji biomarker za procenu sistemskih efekata oksidativnog stresa (37). Izlučivanje 8-oxodG-a je rezultat sinhronizovanih procesa oksidativnog oštećenja DNK i njene reparacije.

U našoj studiji, dobijeni povišen nivo 8-oxodG-a u urinu kod HOBP-pacijenata (Tabela 18.) u skladu je sa literaturnim podacima istraživanja (43, 135). Visok nivo 8-oxodG-a je dobijen kod pacijenata sa emfizemom pluća (135), a takođe je dokazano da oksidativno oštećenje DNK ima značajnu ulogu u patogenezi HOBP-a (43). U našoj

studiji, biomarker 8-oxodG predstavlja nezavisni prediktor za nastanak HOBP-a, što je potvrda kliničkog značaja ovog urinarnog biomarkera u nastanku HOBP.

Pušenje predstavlja najznačajniji sredinski faktor rizika za nastanak HOBP-a. Duvanski dim izaziva zapaljenje u disajnim putevima, što posledično dovodi do hiperinflamacije i ograničenja protoka vazduha kroz pluća (136). Kotinin, glavni metabolit nikotina, zbog svoje specifičnosti i osetljivosti prepoznat je kao najbolji biomarker za procenu stepena izloženosti duvanskom dimu (66). Povišen nivo kotinina u urinu je u korelaciji sa povećanom izloženošću duvanskom dimu. Prethodne studije su pokazale povišene vrednosti kotinina u urinu kod pušača u odnosu na nepušače (66, 137). Visok nivo urinarnog kotinina kod pušača, u našoj populaciji, potvrđuje značaj kotinina kao biomarkera za procenu stepena izloženosti duvanskom dimu (Slika 12a. i Tabela 10.). Međutim, analiza uticaja pola na povezanost pušačkih navika sa nivoom urinarnog kotinina, pokazala je značajno povišen nivo kotinina kod žena pušača u odnosu na žene nepušače, i kod zdravih žena i kod pacijentkinja sa HOBP-om (Slika 13a. i Tabela 11.). Međutim, urinarni kotinin nije predstavljao značajan faktor rizika za nastanak HOBP-a (Tabele 8, 10 i 13.). Ranije studije su pokazale da su klirensi nikotina i kotinina značajno viši kod žena u odnosu na muškarce, kao i da primena oralnih kontraceptiva, kod žena, dodatno povećava njihovo izlučivanje. Dodatno, među pušačima, više vrednosti kotinina u urinu kod žena ukazuju na brži metabolizam nikotina kod žena u odnosu na muškarce (66). Dobijeni rezultat pokazuje da postoje polne razlike u efikasnosti primene kotinina kao kvantitativnog biomarkera za procenu izloženosti nikotinu, zbog polnih razlika u metabolizmu nikotina.

Dobro je poznat i u mnogim studijama dokazan udružen uticaj pušenja i oksidativnog stresa na nastanak HOBP-a. Stepem izloženosti duvanskom dimu utiče kako na nivo oksidativnog stresa, tako i na nivo antioksidativne zaštite organizma. Prethodne studije su pokazale različit uticaj pušenja na parametre oksidativnog stresa. Istraživanje sprovedeno u Bugarskoj pokazalo je da pušenje utiče na smanjenje antioksidativne zaštite kod HOBP-pacijenata, dok je kod zdravih ispitanika ovaj efekat izostao (138). Nasuprot tome, Rahman i saradnici su utvrdili da pušenje utiče na snižen nivo antioksidativne zaštite i kod zdravih osoba (139). Dodatno, u turskoj populaciji, pacijenti su imali više vrednosti za TOS, a niže vrednosti za TAC u odnosu na zdrave-pušače i zdrave-nepušače (140). Dvogodišnja studija sprovedena u Indiji, pokazala je da

se kod pacijenata sa HOBP, nivoi TOS i OSI nisu razlikovali između pušača i nepušača (52). Slični rezultati su dobijeni i u našoj studiji. Pacijenti su imali više nivoe oksidativnog stresa (TOS i OSI) u odnosu na kontrolu, bez obzira na pušački status (Slika 12c., Slika 12d. i Tabela 10.). Isti trend razlika je bio prisutan i kod oba pola (Slika 13c., Slika 13d. i Tabela 11.). Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je nastanak HOBP-a povezan sa povišenim oksidativnim stresom različite etiologije: pro-oksidansima iz duvanskog dima, izloženošću nepušača pasivnom pušenju, delovanjem drugih aerozagađivača i veoma reaktivnim vrstama iz aktiviranih inflamatornih ćelija. Istraživanje sprovedeno u Kini, koje je obuhvatilo oko 6000 nepušača, pokazalo je da pasivno izlaganje duvanskom dimu povećava rizik za nastanak HOBP (141).

Ispitivanjem uticaja pušenja na antioksidativnu zaštitu organizma, pokazano je da pušenje nije uticalo na nivo TAC, iako se na Slici 12b. zapažaju neočekivano više vrednosti za TAC kod pušača u obe grupe ispitanika, ali bez statistički značajne razlike (Tabela 10.). Takođe, neočekivano je dobijen najviši nivo TAC kod HOBP-pušača u odnosu na ostale grupe, ali bez statistički značajne razlike (Slika 12b. i Tabela 10.). Visok nivo TAC kod pušača može biti posledica povećanog unošenja antioksidanasa hranom, ili povećane sinteze endogenih antioksidanasa, kao fiziološki odgovor na povećan nivo pro-oksidanasa, naročito kod HOBP-pušača. Muškarci su imali više vrednosti TAC u odnosu na žene, sa najvećom razlikom u grupi HOBP-pušača (Slika 13b. i Tabela 11.). Snižen nivo TAC kod žena može biti objašnjen značajnom ulogom estrogena u nastanku oksidativnog stresa kod žena. Estrogen dovodi do ubrzanog metabolizma komponenti iz duvanskog dima, povećavajući ekspresiju CYP P-450 enzima. Povećana ekspresija ovih enzima dovodi do povećanog stvaranja toksičnih metabolita, kao što su derivati policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU). S obzirom da estrogen deluje samo na CYP P-450 enzime, a ne deluje na druge enzime koji učestvuju u detoksikaciji (mEPH i GST), kod žena pušača dolazi do povećanog stvaranja oksidanasa i smanjenog antioksidativnog odgovora. Na ovaj način estrogen pojačava osetljivost žena na dejstvo duvanskog dima i drugih štetnih supstanci iz spoljašnje sredine što posledično dovodi do nastanka oksidativnog stresa i smanjenja njihove antioksidativne zaštite (142).

U drugom delu studije, analiziran je uticaj pušenja na oksidativnu modifikaciju DNK, s obzirom na veliki značaj DNK lezija u patogenezi HOBP-a. Dobijen je značajno povišen nivo urinarnog 8-oxodG/kreatinina kod HOBP-pacijenata u grupama pušača i bivših pušača, kod oba pola (Tabela 19., Slika 17. i Tabela 21.). Visoke vrednosti urinarnog 8-oxodG/kreatinina, izmerene kod bivših pušača, ukazuju na kumulativni efekat pušenja na nastanak DNK lezija i nakon prestanka izlaganja duvanskom dimu. U studiji sprovedenoj u Italiji (143), takođe je dobijen povećan nivo 8-oxodG-a u plućima pušača (sa ili bez HOBP) u poređenju sa nepušačima. U istoj studiji je dobijen povećan broj DNK oštećenja i mesta reparacije kod HOBP-pušača u poređenju sa nepušačima, što ukazuje da kod pacijenata postoji neravnoteža između procesa oštećenja DNK i reparacije DNK. Mesaros i saradnici su na osnovu svojih istraživanja, gde je uočen značajno viši nivo urinarnog 8-oxodG-a kod pušača, predložili urinarni 8-oxodG/kreatinin za najbolji biomarker procene oksidativnog stresa izazvanog duvanskim dimom (42). Studija sprovedena među finskom populacijom (144), pokazala je da se prestankom pušenja značajno smanjuje nivo izlučenog 8-oxodG-a, čime je potvrđeno da pušenje povećava stopu oksidativnog DNK oštećenja. Uzimajući u obzir rezultate naše studije i literaturne podatke, zaključujemo da je urinarni 8-oxodG bolji biomarker za procenu uticaja pušenja na razvoj oksidativnog stresa, povezanog sa nastankom HOBP u odnosu na serumske biomarkere TOS i OSI.

Brojne studije su pokazale da visoka izloženost duvanskom dimu kod HOBP-pacijenata dovodi do ubrzanog smanjenja plućne funkcije i doprinosi progresiji HOBP do ireverzibilnog emfizema (145, 146). Iako, u našoj studiji nisu dobijene značajne korelacije između nivoa urinarnog kotinina i spirometrijskih parametara plućne funkcije (Tabela 15.), uočen je trend porasta kotinina u grupi pušača sa teškim/veoma teškim oblikom HOBP u odnosu na grupu pacijenata pušača sa blagim/umerenim HOBP, ali bez statističke značajnosti. Međutim, u našoj studiji je nivo urinarnog kotinina bio statistički značajno povišen kod pacijenata-pušača sa teškim/veoma teškim oblikom HOBP u odnosu na nepušače sa istom težinom bolesti, dok u grupi pacijenata sa blagim/umerenim oblikom HOBP nije bilo razlike u nivou kotinina između pušača i nepušača (Slika 15a. i Tabela 16.). U finskoj populaciji (147) dobijen je značajno viši nivo kotinina kod pacijenata-pušača sa teškim oblikom HOBP u odnosu na one sa umerenim oblikom, što ukazuje na značajan uticaj nivoa kotinina na razvoj HOBP.

Očekivano, kod HOBP-pacijenata dobijena je pozitivna korelacija između parametara antioksidativne zaštite (TAC) i spirometrijskih markera plućne funkcije (FEV1/FVC), kao i negativna korelacija između parametara oksidativnog statusa (TOS i OSI) i funkcije pluća (FEV1 i FVC) (Tabela 15.). Povećana osetljivost pušača da razviju težak oblik HOBP je verovatno posledica neadekvatne antioksidativne zaštite, što pokazuje trend pada serumskog TAC koji je dobijen kod pacijenata pušača sa teškim/veoma teškim oblikom HOBP u odnosu na pacijente-pušače sa blagim/umerenim HOBP, ali bez statističke značajnosti (Slika 15b.). Iako nije uočena statistički značajna razlika, pacijenti-nepušači sa teškom/veoma teškom HOBP su imali više vrednosti markera oksidativnog stresa, TOS i OSI, u odnosu na nepušače sa blagim/umerenim oblikom HOBP (Slika 15c. i Slika 15d.). Ovi rezultati ukazuju na veći značaj endogenih pro-oksidanasa kod teške forme HOBP, u odnosu na pro-oksidanse iz duvanskog dima.

Analiza polnih razlika na parametre oksidativnog stresa u zavisnosti od težine HOBP je pokazala da žene sa teškim/veoma teškim oblikom HOBP imaju značajno nižu antioksidativnu zaštitu (niži TAC) u odnosu na muškarce iz iste ispitivane grupe (Tabela 14.). Povećana osetljivost žena na neadekvatnu antioksidativnu zaštitu, prethodno je već uočena kao faktor rizika za nastanak HOBP, naročito u grupi pušača (Slika 13b. i Tabela 11.). U studiji sprovedenoj u norveškoj populaciji (148), primećena je povećana osetljivost žena za razvojem teškog oblika HOBP, čak i pri niskom stepenu izloženosti duvanskom dimu. Iz ovoga zaključujemo da su žene, posebno izložene riziku od pojave i progresije HOBP, usled neadekvatne antioksidativne zaštite, što bi imalo potencijalni klinički značaj u prevenciji HOBP kod žena.

Naši rezultati u pogledu postojanja korelacija između parametara oksidativnog stresa i plućne funkcije potvrđeni su u prethodnim studijama. Salama i saradnici su u populaciji Egipćana dokazali da su nivoi ukupnih antioksidanasa sniženi u serumu HOBP-pacijenata i u pozitivnoj korelaciji sa parametrima plućne funkcije (149). Nasuprot tome, Rahman i saradnici nisu dokazali korelaciju između TAC i spirometrijskih parametara FEV1 i FEV1/FVC (150). Neslaganja u rezultatima prethodnih studija mogu se pripisati rasnoj ili etičkoj varijabilnosti ispitanika. U dve studije, sprovedene u Indiji, dokazano je da je kod HOBP-pacijenata sa veoma teškim oblikom bolesti prisutan značajno viši nivo parametara oksidativnog stresa, a niži nivo

parametara antioksidativne zaštite u odnosu na pacijente sa blagom, umerenom ili teškom HOBP (151, 152). U bugarskoj i egipatskoj populaciji je takođe potvrđen najniži nivo TAC kod HOBP-pacijenata sa najtežim oblikom bolesti, u odnosu na blaže oblike (55, 138). Na osnovu visokih vrednosti TOS kod HOBP pacijenata sa veoma teškim oblikom bolesti, Can i saradnici su predložili TOS kao potencijalni biomarker za procenu težine HOBP (153). Na osnovu svega prethodno navedenog, može se zaključiti da povišeni oksidativni stres, usled neravnoteže između oksidanasa i antioksidanasa predstavlja rizik ne samo za nastanak, nego i za razvoj HOBP.

Analiza povezanosti sistemskog efekta oksidativnog stresa na oksidativno oštećenje DNK i kumulativnih štetnih efekata višegodišnjeg pušačkog staža pokazala je statistički značajne povišene vrednosti za 8-oxodG kod pacijenata sa teškim oblikom HOBP-a, koji su pri tome bili teški pušači (>30 paklo/godina) u odnosu na umerene pušače (<30 paklo/godina) (Slika 19. i Tabela 23.). Pored toga, u grupi teških pušača, pacijenti sa veoma teškim oblikom bolesti su imali značajno viši nivo urinarnog 8-oxodG-a u odnosu na one sa umereno teškom bolešću. Iz ovoga možemo zaključiti da je težina HOBP povezana sa sistemskim efektima visokog oksidativnog stresa, izazvanog kumulativnim štetnim delovanjem duvanskog dima. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu ulogu oksidativnog stresa, koji je uzrokovan teškim pušenjem, ne samo u nastanku, već i u progresiji HOBP. Rezultati naše studije su saglasni sa rezultatima Igishi-a i saradnika (154), koji su utvrdili da su nivoi 8-oxodG-a značajno povišeni kod pacijenata sa HOBP-bivših pušača u odnosu na zdrave-bivše pušače. Takođe, ovi autori su utvrdili negativne korelacije između 8-oxodG-a i parametara plućne funkcije. S obzirom na činjenicu da DNK lezije mogu biti mutagene, značajan su faktor rizika za kancerogenezu (155) čime se objašnjava povezanost pušenja i povećanog rizika od razvoja karcinoma pluća (156). Smatra se da HOBP i karcinom pluća predstavljaju značajne aspekte iste bolesti, jer dele iste etiološke faktore, od kojih je najznačajniji pušenje, koje povećava oksidativni stres koji dovodi do oštećenja DNK (157). S obzirom na ovo, urinarni 8-oxodG bi se mogao koristiti kao potencijalni prediktor razvoja karcinoma pluća kod pacijenata sa HOBP, posebno onih koji su izloženi sredinskim pro-oksidansima, kakav je duvanski dim.

U brojnim studijama analiziran je uticaj indeksa telesne mase (BMI) na nivo 8-oxodG-a, u različitim telesnim tečnostima. Autori prve studije, u kojoj je pokazana

negativna korelacija između stepena izlučivanja 8-oxodG-a i BMI, kod zdravih osoba, ukazuju da je ubrzan metabolizam kod mršavih osoba povezan sa povišenim biomarkerima sistemskog oksidativnog stresa (158). U studiji koja je uključila 174 zdrava radnika, Mizoe i saradnici (159) su pokazali negativnu korelaciju između nivoa 8-oxodG u urinu i BMI, što ukazuje da je gubitak telesne težine povezan sa povećanim oksidativnim oštećenjem DNK, koje povećava rizik za nastanak karcinoma pluća. Rezultati naše studije pokazuju da BMI ima uticaja na nivo urinarnog 8-oxodG-a samo u grupi pacijenata, ali ne i kod zdravih osoba (Tabela 22.). Najviši nivo oksidativnog stresa dobijen kod pothranjenih pacijenata ( $BMI < 18 \text{ kg/m}^2$ ) (Slika 18.) može ukazivati na smanjen nivo fizioloških antioksidanasa zbog nedostatka prekursora za njihovu sintezu.

U našoj studiji primećen je uticaj starenja na nivo izlučenog 8-oxodG-a kod zdravih ispitanika (Tabela 20.). Kod zdravih ispitanika, starijih od 50 godina, uočen je značajno viši nivo urinarnog 8-oxodG-a u odnosu na mlađe od 50 godina. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Sakano-e i saradnika (160), koji ukazuju na vezu između nivoa izlučenog 8-OHdG-a i godina starosti. Dodatno, Andreoli i saradnici (161) su dokazali pozitivnu korelaciju između urinarnog izlučivanja 8-oxodG-a i starenja, ali samo u populaciji muškaraca.

Poznato je da HOBP predstavlja inflamatorno oboljenje i različite studije su pokazale značajan porast inflamatornih markera kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (162, 163). U našoj studiji, HOBP-pacijenti su imali značajnu leukocitozu u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 18.). Rezultat naše studije je u skladu sa literaturnim podacima. Skorašnja meta-analiza, koja je uključila 10677 HOBP-pacijenata i 28660 kontrolnih ispitanika, pokazala je značajnu korelaciju između povećanog broja cirkulišućih leukocita i nastanka HOBP-a (164). Fattouh i Alkady (165) su utvrdili značajnu pozitivnu korelaciju između broja leukocita i HOBP egzacerbacija. Uzrok inflamacije u HOBP se pripisuje efektima duvanskog dima i drugih štetnih supstanci iz spoljašnje sredine na porast oksidativnog stresa, koji posledično dovodi do regrutovanja inflamatornih ćelija u plućima. Oksidansi prisutni u duvanskom dimu stimulišu inflamatorne ćelije na produkciju slobodnih radikala i oslobađanje medijatora inflamacije, koji dodatno regrutuju inflamatorne ćelije, pri čemu se stvara začarani krug između oksidativnog stresa i inflamacije u HOBP (15).

Anemija predstavlja jedan od najznačajnijih komorbiditeta HOBP (166, 167, 168). Snižen nivo hemoglobina, koji je u korelaciji sa smanjenjem broja eritrocita, predstavlja karakterističan znak anemije kod HOBP-pacijenata u populaciji Srbije (Tabela 18.). Anemija kod HOBP-pacijenata predstavlja značajan prognostički prediktor povećanog mortaliteta i povećanja hospitalizacija kod HOBP-pacijenata (169). Visok stepen inflamacije i starenje su najčešći uzroci nastanka anemije kod HOBP-pacijenata (167, 170, 171).

Jedan od ciljeva ove studije bio je i ispitivanje prediktorske moći analiziranih parametara za pojavu HOBP u ispitivanoj populaciji. Primenom binarne logističke regresije formirani su modeli u okviru kojih su identifikovani prediktori za nastanak HOBP.

Rezultati dobijeni u prvom delu studije su pokazali da starenje, povećanje oksidativnog stresa (OSI), kao i smanjenje indeksa telesne mase (BMI) predstavljaju značajne nezavisne prediktore za nastanak HOBP. Najbolju prediktorsku moć za nastanak HOBP ima povećanje oksidativnog indeksa (OSI). U logističkoj regresionoj analizi, starenje, OSI i BMI su zadržali značajnu prediktivnu sposobnost nakon korekcije prema polu (Tabela 13.).

U drugom delu studije, kumulativno dejstvo duvanskog dima (paklo/godine), starenje, oksidativni stres (povišen nivo 8-oxodG-a u urinu) i inflamacija (povišeni leukociti) predstavljali su značajne nezavisne prediktore za nastanak HOBP (Tabela 32.). Kod oba pola, povišen nivo oksidativnog stresa i inflamacija predstavljaju značajne prediktore za nastanak HOBP. Interesantan nalaz je da visok nivo oksidativnog stresa predstavlja veći rizik za nastanak HOBP kod muškaraca (OR, 95% CI: 8,42, 2,26-31,28), nego kod žena (OR, 95% CI: 3,60, 1,37-9,45). Dodatno, rizik za nastanak HOBP kod muškaraca je povezan sa starenjem, dok je kod žena povezan sa povećanjem kumulativnog dejstva duvanskog dima (Tabela 32.).

Značajan uticaj starenja, kao prediktora za nastanak HOBP kod muškaraca koji je dobijen u našoj studiji, mogao bi biti objašnjen razlikama u dužini telomera kod različitih polova (172). Sve je više dokaza da su telomere kod pacijenata sa HOBP značajno skraćene (30, 173, 174), ali je još uvek nejasno da li je disfunkcija telomere uzrok ili posledica HOBP-a. Na osnovu rezultata, da su kod žena prisutne duže



telomere, sugeriše da je za određeno hronološko doba, biološko starenje kod muškaraca naprednije nego kod žena.

Značajan uticaj teškog pušenja, kao prediktora za nastanak HOBP kod žena, dobijen u našoj studiji u skladu je sa rezultatima dobijenim u prethodnim studijama u kojima je potvrđena polna razlika uticaja pušenja na smanjenje plućne funkcije. Tako je meta-analiza, koja je obuhvatila kohortne studije, otkrila značajan pad plućne funkcije kod žena-pušača u odnosu na muškarce-pušače (175). Pored toga, pokazano je da žene-pušači imaju veće oksidativno oštećenje, bez obzira na to što imaju više nivoe liposolubilnih antioksidanasa (176).

Kako su se naši parametri oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i izloženosti duvanskom dimu u serumu i urinu, uglavnom značajno razlikovali između pacijenata i zdravih osoba, postavljen je cilj da se ispita dijagnostička tačnost ovih parametara u razlikovanju pacijenata od zdravih ispitanika. U analizi dijagnostičke tačnosti, primenom ROC krive parametri oksidativnog stresa (TOS, OSI i 8-oxodG) su imali odličan potencijal razdvajanja pacijenata sa HOBP od zdravih ispitanika (Tabela 12., Slika 14c.; Slika 14d., Tabela 24., Slika 20.).

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđene su cut-off vrednosti za parametre oksidativnog stresa, kao i njihova osetljivost i specifičnost. Dijagnostičke karakteristike ovih biomarkera su bile dobre, osetljivost svih biomarkera je bila preko 70% (71% za TOS, 77% za OSI i 73% za 8-oxodG), specifičnost je bila preko 80% (94% za TOS, 89% za OSI i 86% za 8-oxodG). Literaturni podaci u vezi sa laboratorijskim otkrivanjem i praćenjem HOBP se pretežno odnose na procenu dijagnostičkog značaja parametara inflamacije (177, 178, 179), dok je naša studija prva ukazala na evaluaciju parametara oksidativnog stresa, koji su takođe uključeni u patogenezu HOBP-a.

Rana identifikacija faktora rizika povišenog oksidativnog stresa može biti klinički značajna za ranu identifikaciju osoba koje nose rizik za razvoj plućnih bolesti usled dejstva štetnih faktora spoljašnje sredine, kao i u prevenciji težih oblika bolesti. Isto tako, klinički je značajno merenje stepena oksidativnog stresa, kako u skriningu, tako i u predikciji težine bolesti. Obzirom da je naša studija pokazala da ispitanici biomarkeri oksidativnog stresa imaju dobre dijagnostičke osobine i da imaju vrlo sličnu osetljivost i specifičnost, za rutinsku laboratorijsku praksu najpogodnije bi bilo određivanje oksidativnog indeksa (OSI), zbog jednostavnog izvođenja na automatskom

biohemijskom analizatoru i povoljne cene reagenasa. Merenje nivoa 8-oxodG-a u urinu, primenom visoko-osetljive masene spektroskopije, nije pogodno za rutinsku primenu procene stepena oksidativnog stresa, jer zahteva skupu opremu i posebno obučeno osoblje.

## **5.2. Genetski faktori rizika i njihove interakcije sa sredinskim faktorima u nastanku i razvoju HOBP**

Iako pušenje predstavlja najznačajniji faktor rizika za razvoj HOBP, svega 25% hroničnih teških pušača razvije simptomatsku formu HOBP-a, što ukazuje na genetske faktore rizika za razvoj ove bolesti (71). Razlike u preosetljivosti za nastanak HOBP-a uslovljene su genskim varijantama enzima, uključenih u detoksikaciju produkata duvanskog dima. Pluća su sposobna da metabolišu mnoge ksenobiotike, specifičnim metaboličkim putevima, koji uključuju brojne enzime I i II faze ksenobiotičkog metabolizma. Tokom prve faze (faza I) metabolizma, štetne supstance se prevode u reaktivne intermedijere, dok se u drugoj fazi (faza II) vrši njihova detoksikacija (74). U ovoj studiji izučavane su odabrane funkcionalne genske varijante enzima, koji su uključeni u metabolizam ksenobiotika i odbranu od oksidativnog stresa, s obzirom da njihovo prisustvo može dovesti do poremećaja ravnoteže oksidansi-antioksidansi i povećanog oksidativnog stresa, jednog od glavnih etioloških faktora za nastanak HOBP.

Jedan od najznačajnijih enzima, uključenih u I fazu metabolizma ksenobiotika, CYP1A1 uključen je u bioaktivaciju policikličnih aromatičnih ugljovodonika (PAU), koji su u visokoj koncentraciji prisutni u duvanskom dimu. Ekspresija gena CYP1A1 najčešće je indukovana štetnim supstancama prisutnim u duvanskom dimu (74). Dodatno, genska varijanta CYP1A1 \*2A (T3801C), koja se nalazi na 3' flanking regionu gena, ima dvostruko veću mikrozomalnu aktivnost ovog enzima (76). U brojnim studijama, ispitana je povezanost genske varijante CYP1A1 gena i nastanka plućnih bolesti, uključujući HOBP i karcinom pluća, ali su rezultati bili kontroverzni. U studijama sprovedenim u Japanu, Indiji i Mongoliji dokazana je povezanost CYP1A1 \*2A genske varijante, koja ima veći kapacitet metaboličke aktivacije PAU iz duvanskog dima, sa nastankom HOBP i karcinomom pluća (77, 78, 180). U populaciji belaca uočena je korelacija između CYP1A1 \*1A/\*2A genotipa sa zajedničkim prisustvom

emfizema i karcinoma pluća (181). U studiji sprovedenoj u Indiji, uočeno je da prisustvo homozigotne CYP1A1 \*2A genske varijante predstavlja nezavisni faktor rizika za nastanak karcinoma pluća (79), dok je u Kini ova homozigotna varijanta pokazala i značajnu povezanost sa veoma teškim oblikom HOBP (80). Nasuprot tome, u studiji sprovedenoj u Japanu, Budhi i saradnici (182) nisu uočili značajnu povezanost između varijante CYP1A1 i karcinoma pluća. U našoj studiji nije uočena razlika u frekvenciji heterozigotne varijante CYP1A1 \*2A između pacijenata i kontrolne grupe, a kod obe grupe ispitanika nije otkriven CYP1A1 \*2A homozigot (Tabela 25.). U našoj populaciji nije nađena povezanost varijante CYP1A1 \*2A sa nastankom HOBP, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u populaciji Brazila (81). Naši rezultati nisu pokazali povezanost genskih varijanti CYP1A1 enzima i pojave HOBP u zavisnosti od pušačkog statusa (pušači, bivši pušači i nepušači) (Tabela 28.). Kako je enzim CYP1A1 uključen u prvu fazu metabolizma ksenobiotika, prisustvo CYP1A1 \*2A varijante favorizuje ovu reakciju i može dovesti do akumulacije reaktivnih intermedijera, što ukazuje na individualne razlike u osetljivosti na toksično delovanje ksenobiotika. S obzirom da u metabolizmu ksenobiotika učestvuju i enzimi detoksikacije, njihova aktivnost je takođe značajna u odbrani protiv reaktivnih intermedijera nastalih u prvoj fazi detoksikacije i trebalo bi da aktivnosti enzima obe faze metabolizma ksenobiotika budu sinhronizovane. Ukoliko je aktivnost enzima druge faze metabolizma ksenobiotika, očuvana i sinhronizovana sa enzimima prve faze, aktivirani intermedijeri neće ostvariti toksični efekat. Ovo može objasniti izostanak povezanosti genske varijante CYP1A1 \*2A sa HOBP u našoj populaciji. Stoga se može pretpostaviti da pored prisustva CYP1A1 \*2A alela, prisustvo genskih varijanti koje smanjuju efikasnost enzima II faze metabolizma detoksifikacije, mogu dovesti do povećanog oksidativnog stresa.

Mikrozomalne hidrolaze epoksida (mEPHX) predstavljaju familiju enzima koji katalizuju hidrolizu arena i alifatičnih epoksida u manje reaktivne dihidrodiole koji su rastvorljivi u vodi. U okviru mEPHX gena opisane su dve genske varijante. Kod jedne, dolazi do amino-kiselinske zamene tirozina sa histidinom na poziciji 113 polipeptidnog lanca (Tyr113His) i koja utiče na smanjenje aktivnosti enzima za oko 40% (slow, S alel), dok druga varijanta dovodi do zamene histidina sa argininom na poziciji 139 (His139Arg), što rezultuje povećanjem aktivnosti enzima za 25% (fast, F alel) (84). U

jednoj od prvih studija, primećeno je da homozigotni nosioci S alela (113His/113His) imaju povećan rizik za pojavu HOBP i emfizema (126). Ova činjenica je kasnije potvrđena i u slovačkoj populaciji (86). U dve studije sprovedene u Kini (88, 92) i jednoj u Mađarskoj (89), potvrđena je značajna povezanost između Tyr113His varijante i nastanka HOBP. Dodatno, Li i saradnici (92) su utvrdili da prisustvo 139His/139Arg genotipa smanjuje rizik za nastanak HOBP. Studija koja je sprovedena u Indiji pokazala je veću frekvenciju 113His alela kod obolelih od HOBP i 139Arg alela kod zdravih osoba (107). U kineskoj populaciji je otkriveno da homozigotni nosioci 113His/113His, pušači oboleli od HOBP imaju povećan rizik za nastanak težeg oblika ove bolesti (98).

Distribucija analiziranih alela i genotipova, za mEPHS i mEPHF enzime, u našoj studiji nije pokazala povezanost sa pojavom HOBP (Tabela 25.). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija, u kojima nije utvrđena povezanost između mEPHS ili mEPHF genskih varijanti i nastanka HOBP (90, 183, 184). Takođe, u našoj populaciji nije utvrđena povezanost pušačkog statusa i genskih varijanti mEPHS i mEPHF u nastanku HOBP (Tabela 28.). Uočene kontradiktornosti u rezultatima pomenutih studija mogu biti objašnjene razlikama u odabiru pacijenata i kontrolne grupe, kao i heterogenošću u pogledu genetskih osobina različitih etičkih populacija.

Uzimajući u obzir da je HOBP kompleksna bolest, očekivano je da varijante pojedinačnog gena mogu imati mali etiološki efekat na nastanak HOBP, dok prisustvo varijanti više gena može imati značajnu udruženu ulogu u patogenezi HOBP. Na osnovu enzimске aktivnosti, kombinacije mEPHS i mEPHF genotipova moguće je klasifikovati u tri fenotipa: sa niskom, srednjom i visokom aktivnošću (93). Analizom dobijenih rezultata nisu uočene značajne razlike u distribucijama kombinovanih mEPH genotipova sa različitom enzimskom aktivnošću, između kontrole i pacijenata (Tabela 26.) Distribucije složenih mEPH fenotipova sa niskom, srednjom i visokom aktivnošću, u kontrolnoj grupi (39%, 42% i 19%, redom) i kod HOBP-pacijenata (44%, 41% i 15%, redom) u skladu su sa distribucijama ovih fenotipova dobijenim u šest evropskih zemalja, u kontrolnoj grupi (36%, 43% i 20%, redom) i kod HOBP-pacijenata (35%, 45% i 20%, redom) (90).

Iako nije utvrđen značajan uticaj različitih mEPH fenotipskih aktivnosti na nastanak HOBP, primećeno je da pacijenti-teški pušači, sa povišenim oksidativnim stresom koji su nosioci mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću imaju

značajno smanjenu funkciju pluća (Slika 24.). Značajno smanjenje funkcije pluća kod ovih pacijenata ukazuje na veoma težak oblik HOBP prema GOLD klasifikaciji (122), sa procenjenim vrednostima FEV1<30% od predviđenog. Pacijenti sa istom mEPH fenotipskom aktivnošću, ali bez povećanog oksidativnog stresa i teških pušačkih navika, imali su znatno bolje nalaze spirometrijskih parametara. Vrednosti spirometrijskih parametara kod ovih pacijenata ukazuju na prisustvo blagog ili umerenog oblika HOBP (50-80% od predviđenog FEV1; 30-49% od predviđenog FEV1, redom). Plućna funkcija se nije razlikovala u odnosu na oksidativni stres i pušenje u grupama pacijenata sa sredjom i visokom mEPH fenotipskom aktivnošću. Obzirom da je mEPH enzim odgovoran za brzu biotransformaciju štetnih reaktivnih epoksida, osobe sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću imaju potencijalni rizik za nastanak bolesti koje su povezane sa oksidativnim stresom, kao što je HOBP. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima studije sprovedene u populaciji belaca, u kojoj je utvrđen značajan pad plućne funkcije kod pacijenata-pušača sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću (115). Slične rezultate su dobili Park u saradnici (85), koji su pokazali da postoji značajna dozno-zavisna korelacija između pušenja i težine bolesti kod pacijenata koji su homozigotni nosioci 113His alela. Prema našim saznanjima, u ovoj studiji je prvi put otkrivena podgrupa teških pušača sa niskom mEPH fenotipskom aktivnošću i povišenim oksidativnim stresom, koji su verovatno pored duvanskog dima izloženi i drugim pro-oksidansima, sa verovatno neadekvantom antioksidativnom zaštitom, koji mogu razviti veoma težak oblik HOBP.

Na osnovu svega navedenog, zaključujemo da izolovano prisustvo mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću ne predstavlja rizik za smanjenje plućne funkcije. Kao potvrda toga, kod pacijenata sa istom enzimskom aktivnošću, koji nisu ili su delimično izloženi bar jednom faktoru rizika (teško pušenje ili visok oksidativni stres) primećene su više vrednosti plućnih parametara. Ova interakcija između gena i okoline može biti klinički značajna u prevenciji i praćenju teškog oblika HOBP-a. Stoga, u ranoj identifikaciji HOBP-pacijenata sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću, prekid pušenja i tretman antioksidativnom terapijom, mogu delovati preventivno na nastanak teškog oblika HOBP-a.

Glutation-S-transferaze (GST) čine veliku familiju enzima koji učestvuju u detoksikaciji različitih elektrofilnih jedinjenja. Iako klasa GST enzima ima važnu ulogu

u detoksikaciji, dva najznačajnija izoenzima GSTM1 i GSTT1 su u velikom procentu azijske populacije zastupljene kao delecije genske varijante, GSTM1 \*nulti genotip sa 54,5% i GSTT1 \*nulti genotip sa 48,3% (185). U populaciji belaca, učestalost GSTM1 \*nultog genotipa iznosi 49,2% dok je GSTT1 \*nulti genotip zastupljen sa 23,9% (186). U dosadašnjim studijama ustanovljena je povezanost GSTM1 \*nultog genotipa sa prisustvom emfizema kod pacijenata sa karcinomom pluća (119, 187). U studijama sprovedenim u Francuskoj i na Tajvanu potvrđena je uloga GSTM1 \*nultog genotipa u razvoju HOBP, kao i njegova udruženost sa teškim oblikom HOBP (98, 120). Mehrotra i saradnici su utvrdili značajan uticaj GSTT1 \*nultog genotipa u nastanku HOBP-a, u populaciji muškaraca (100). Skorašnja studija je pokazala da delecije GSTM1 i GSTT1 gena predstavljaju rizik za razvoj HOBP (188). U našoj zdravoj populaciji, učestalost delecije za GSTM1 gen iznosi 46%, a za GSTT1 iznosi 27%, što je približno rezultatima dobijenim u populaciji Evropljana (189). Grupu pacijenata karakterišu slične učestalosti delecija, za GSTM1 55% i za GSTT1 27%, a poređenjem sa kontrolnom grupom nije uočena statistički značajna razlika u njihovoj distribuciji (Tabela 25.). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima studije koju su sproveli Hersh i saradnici, u kojoj nije uočena korelacija između GSTM1 genotipa i nastanka HOBP (190). Slično, studije sprovedene u Brazilu, Kini i Koreji nisu pokazale značaj genskih varijanti GSTM1 i GSTT1 gena u nastanku HOBP-a (81, 183, 191).

Iako nije utvrđena povezanost između GSTM1 i GSTT1 varijanti i nastanka HOBP u populaciji Srbije, pokazano je da prisustvo GSTM1 \*nultog genotipa, kod pušača, predstavlja faktor rizika za nastanak HOBP (Tabela 28.). Prisustvo GSTM1 \*nultog genotipa, kod pušača, povezano je sa dva puta većim rizikom za razvoj HOBP nego prisustvo GSTM1 \*plus genotipa (OR, 95% CI: 2,27, 1,00-5,19) (Tabela 28.). Ova povezanost se može objasniti značajnom ulogom aktivnog GSTM1 enzima u detoksikaciji štetnih supstanci iz duvanskog dima i sprečavanju nastanka oksidativnog stresa.

U našoj studiji, složeni GSTM1/GSTT1 genotip bio je povezan sa različitom osetljivošću za razvoj HOBP. Složeni GSTM1/GSTT1 genotip sa najmanje jednom delecijom (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) predstavlja značajan faktor rizika za razvoj HOBP kod žena-pušača (Slika 21c.). Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Faramawy-a i saradnika koji su dokazali da prisustvo GSTM1 \*nultog genotipa

predstavlja rizik za razvoj HOBP, posebno kada je u kombinaciji sa GSTT1 \*nultim genotipom (99). Takođe, studija sprovedena u Indiji je pokazala da prisustvo bar jedne delecije u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu predstavlja rizik za razvoj HOBP (118). Međutim, u našoj studiji je prvi put otkrivena polna razlika u osetljivosti prema HOBP povezanoj sa genskim varijantama GSTM1 i GSTT1, pa je utvrđeno da žene koje su nosioci složenog GSTM1 \*nultog/GSTT1 \*nultog genotipa imaju 23 puta veći rizik za razvoj HOBP u odnosu na žene koje su nosioci ostalih kombinacija ovih gena (Tabela 27.), dok kod muškaraca nije utvrđen rizik. Nasuprot tome, u zdravoj populaciji, muški pol je imao skoro 17 puta veću verovatnoću da bude nosilac delecijске genske varijante za GSTM1 i GSTT1 u odnosu na žene (Tabela 27.). Dodatna analiza povezanosti delecijских genskih varijanti za GSTM1 i GSTT1 i pušačkog statusa sa rizikom od nastanka HOBP, potvrdila je da žene nosioci bar jedne delecije na bilo kom od ova dva gena imaju tri puta veći rizik da obole od HOBP, u odnosu na žene koje nemaju delecijску gensku varijantu (Slika 21a.). Ovaj rizik se značajno povećava kod žena koje su aktivni pušači i one imaju preko sedam puta veći rizik da obole od HOBP ukoliko su nosioci bar jedne delecije na GSTM1 ili GSTT1 genu (Slika 21c.).

U skladu sa prikazanim rezultatima, primenom binarnog logističkog modela utvrđeno je da složen GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti genotip predstavlja nezavisni prediktor za razvoj HOBP kod žena, ali ne i kod muškaraca (Tabela 32.). Kao što je ranije pomenuto, pušenje predstavlja nezavisni faktor rizika za razvoj HOBP kod žena, ali ne i kod muškaraca (Tabela 32.). Naši rezultati mogu biti objašnjeni značajnom ulogom estrogena u povećanju oksidativnog stresa, koji utiče na povećanu osetljivosti žena-pušača za razvoj HOBP (142). Estrogen povećava ekspresiju CYP1A1 enzima, pri čemu dolazi do ubrzanog metabolizma komponenti iz duvanskog dima i povećane produkcije oksidanasa, kod žena (192). Uzimajući u obzir da GSTM1 i GSTT1 imaju značajne uloge u detoksikaciju nastalih oksidanasa, izostanak njihove aktivnosti, usled delecije ovih gena, dovodi do nastanka oksidativnog stresa i posledičnog razvoja HOBP kod žena. S obzirom da estrogen utiče na dodatno povećanje oksidativnog stresa, usled izlaganja štetnim supstancama, moguće je objasniti značajnu ulogu GSTM1 \*nultog/GSTT1 \*nultog genotipa u nastanku HOBP kod žena, u odnosu na muškarce.

Analizom složenih genotipova, nastalih kombinacijom mEPHS, GSTM1 i GSTT1 gena, nije uočena statistički značajna povezanost ovih genotipova sa nastankom

HOBP (Tabela 26.). Međutim, oučeno je da nosioci složenog genotipa sa niskom fenotipskom aktivnošću mikrozomalne hidrolaze epoksida i genske delecije na oba enzima glutation-S-transferaze (mEPH niska aktivnost/GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti) imaju skoro četiri puta veći rizik da obole od HOBP u odnosu na osobe koje su nosioci ostalih kombinacija genskih varijanti ( $p=0,074$ ;  $OR=3,79$ ), ali je verovatnoća bila na granici značajnosti (Tabela 26.). Isto tako je uočeno, da nakon korekcije za godine starosti i kumulativni efekat pušenja (paklo/godine), nosioci mEPH sa niskom fenotipskom aktivnošću i genskih varijanti GSTM1 i GSTT1 sa očuvanom enzimskom aktivnošću (mEPH niska aktivnost/GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus) imaju skoro tri puta manju verovatnoću da obole od HOBP ( $p=0,079$ ;  $OR=0,35$ ), ali je verovatnoća takođe bila na granici značajnosti (Tabela 26.). Dobijeni rezultati potvrđuju da je za efikasnu detoksikaciju ksenobiotika važna sinhronizacija enzimске aktivnosti enzima koji učestvuju u detoksikaciji. U našoj studiji je pokazano da prisustvo mikrozomalne hidrolaze epoksida sa niskom aktivnošću postaje faktor rizika za HOBP, samo kada su istovremeno prisutne neaktivne genske varijante GSTM1 i GSTT1 enzima. S druge strane, mEPH niske aktivnosti u kombinaciji sa aktivnim genskim varijantama GSTM1 i GSTT1 enzima, obezbeđuje zaštitu od pojave HOBP, verovatno zbog efikasnog ukljanjanja aktivnih metabolita, jer sporo nastaju i mogu biti efikasno detoksikovani. Ovi rezultati ukazuju na to da je za pravilnu interpretaciju rezultata asociativnih analiza genskih varijanti enzima uključenih u detoksikaciju egzogenih štetnih materija, ispravnije analizirati složene genske varijante enzima koji su povezani u metaboličkom putu.

Naši rezultati su saglasni sa rezultatima dobijenim u slovačkoj populaciji, gde je uočen značajan uticaj složenog GSTM1 \*nultog/113His/113His genotipa u nastanku HOBP-a (86).

GSTP1 izoenzim je najviše ekspimiran u plućnim makrofagama i epitelu bronhiola i alveola. U našoj studiji, distribucija alela i genotipova varijante Ile105Val kod obolelih od HOBP je bila slična kao i u kontrolnoj grupi, tj. nije ustanovljeno da ispitivana GSTP1 varijanta može biti povezana sa nastankom bolesti (Tabela 25.). Takođe, nisu utvrđene razlike u distribucijama GSTP1 Ile105Val genotipova između pacijenata i kontrole, u grupama sa različitim pušačkim navikama (Tabela 28.). U pogledu uloge genske varijante Ile105Val u nastanku HOBP u literaturi postoje



kontroverzni rezultati. U ranijoj studiji ustanovljena je povezanost genotipa Ile105Ile sa HOBP (103). Takođe, u studiji sprovedenoj u Turskoj utvrđena je asocijacija 105Ile alela sa nastankom HOBP (104). Nasuprot tome, Yan i saradnici su u svojoj meta-analizi pokazali udružnost Val105Val genotipa sa nastankom HOBP (108). Istraživanja sprovedena u Indiji, Tunisu i Rusiji utvrdila su da Val105 alel predstavlja faktor rizika za razvoj HOBP (105, 106, 107). Rezultati dobijeni u našoj studiji nisu potvrdili ulogu genske varijante Ile105Val u patogenezi HOBP, što je u skladu sa rezultatima drugih studija (81, 98, 193). Skorašnja meta-analiza, koja je uključila sedamnaest studija, nije pokazala povezanost genske varijante Ile105Val sa nastankom HOBP u azijskoj populaciji, kao ni u populaciji belaca (109).

U okviru ove studije, analiziran je uticaj pušenja i genskih varijanti GSTM1, GSTT1, GSTP1 i mEPH gena na nivo 8-oxodG-a, u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata (Tabela 29. i Tabela 30.). Prisustvo GSTP1 105Val alela povezano je sa visokim nivoom 8-oxodG-a kod HOBP-pacijenata (Slika 22a. i Tabela 29), kao i u grupi HOBP-nepušača (Slika 23a. i Tabela 30.). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima studije Gandhi-a i saradnika (194), koji su dokazali povezanost između GSTP1 Val105Val genotipa i povišenog nivoa 8-OHdG-a kod HOBP-pacijenata. Viši nivo 8-oxodG-a primećen je kod pacijenata sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću, u odnosu na pacijente sa srednjom i visokom mEPH enzimskom aktivnošću (Slika 22b. i Tabela 29). Isti rezultati su dobijeni i u grupi HOBP-nepušača (Slika 23b. i Tabela 30.). Analizom uticaja kombinovanih genotipova, primećene su statistički značajno više vrednosti 8-oxodG-a kod pacijenata sa složenim genotipom GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska aktivnost, u odnosu na nosioce genotipa GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti/mEPH srednja i visoka aktivnost (Slika 22c. i Tabela 29.). U grupi HOBP-nepušača, najviši nivo 8-oxodG-a uočen je kod nosilaca složenog genotipa GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niska aktivnost (Slika 23c. i Tabela 30.). Na osnovu rezultata, može se zaključiti da istovremeno prisustvo GSTP1 105Val alela i mEPH fenotipa sa niskom enzimskom aktivnošću utiče na značajno povećanje oksidativnog stresa kod HOBP-pacijenata, što posledično može dovesti do progresije bolesti.

Rano otkrivanje i identifikacija faktora rizika ima potencijalno veliki značaj u prevenciji nastanka HOBP. U okviru ove studije identifikovani su genetski i ne-genetski faktori rizika, kao i značaj njihovih interakcija za nastanak i razvoj HOBP. Rezultati

studije su pokazali značaj primene ispitivanih biomarkera oksidativnog stresa u dijagnostici i prognostici HOBP. Takođe, rezultati ove doktorske disertacije mogu biti od kliničkog značaja i u prevenciji teškog oblika HOBP, koja bi se sprovodila ranim skriningom genetskih faktora rizika, preveniranjem izloženosti pro-oksidansima i preventivnom antioksidativnom terapijom.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Pacijenti sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (HOBP) imaju povišen nivo markera oksidativnog stresa (TOS i OSI) određenih u serumu, kao i povišen nivo markera sistemskog oksidativnog stresa (8-oxodG/kreatinin) u urinu.
2. Povišene vrednosti urinarnog kotinina kod pušača, u obe ispitivane grupe, kontrolnoj i grupi pacijenata sa HOBP-om ukazuju na specifičan značaj upotrebe ovog markera za procenu stepena izloženosti duvanskom dimu.
3. Žene-pušači su imale značajno viši nivo urinarnog kotinina u kontrolnoj grupi i u grupi HOBP pacijenata u odnosu na žene-nepušače, dok u populaciji muškaraca, nivo kotinina se nije značajno razlikovao u odnosu na pušački status.
4. Najveća razlika u nivou urinarnog kotinina je bila u populaciji pacijenata sa HOBP-om; žene pušači sa HOBP-om su imale viši nivo kotinina u odnosu na muškarce pušače, što ukazuje na povećanu osetljivost žena na dejstvo duvanskog dima u odnosu na muškarce u nastanku HOBP-a.
5. Pušenje nema značajan uticaj na nivo serumskih markera oksidativnog stresa (TOS i OSI) kod HOBP-pacijenata, kao i kod zdravih ispitanika. Muškarci imaju značajno viši nivo antioksidativne zaštite (TAC) od žena, u grupama zdravih-nepušača i pacijenata-pušača.
6. Težina HOBP je povezana sa visokom izloženošću nikotinu: pušači sa teškim i veoma teškim oblikom HOBP su imali značajno povišen nivo urinarnog kotinina u odnosu na nepušače i istom težinom HOBP.
7. U grupi HOBP-pacijenata su dobijene negativne korelacije između markera oksidativnog stresa (TOS i OSI) i parametara plućne funkcije kao i pozitivne korelacije između markera antioksidativne zaštite (TAC) i parametara plućne funkcije, što ukazuje na značaj oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u razvoju bolesti.
8. Povišene vrednosti markera sistemskog oksidativnog stresa (8-oxodG/kreatinina u urinu) kod pacijenata pušača i bivših pušača u odnosu na zdrave pušače i bivše pušače, kod oba pola, potvrđuje da duvanski dim značajno utiče na visok nivo oksidativnog oštećenja DNK kod HOBP-pacijenata.

9. Visok nivo sistemskog oksidativnog stresa (8-oxodG/kreatinina u urinu) kod pacijenata sa veoma teškim oblikom HOBP, koji su pri tome i teški pušači, ukazuje na značaj sistemskog oksidativnog stresa, uzrokovanog teškim pušenjem, u progresiji HOBP.
10. Najviši nivo sistemskog oksidativnog stresa (8-oxodG/kreatinina u urinu) je dobijen kod pothranjenih pacijenata ( $BMI < 18 \text{ kg/m}^2$ ), što ukazuje na značajnu povezanost telesne mase i oksidativnog stresa u nastanku HOBP.
11. Pacijenti sa HOBP se nalaze u stanju inflamacije, koje se karakteriše povećanim vrednostima cirkulišućih leukocita u odnosu na kontrolnu grupu, dok snižen nivo hemoglobina i eritrocita predstavlja karakterističan znak anemije kod HOBP-pacijenata.
12. Dobijena je visoka dijagnostička tačnost parametara oksidativnog stresa; granične vrednosti za TOS (0,055 mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  Equiv./L), OSI (0,0175) i 8-oxodG/kreatinin (1,69 nmol/mmol) se odlikuju visokom osetljivošću (TOS=71%, OSI=77%, 8-oxodG/kreatinin=73%) i specifičnošću (TOS=94%, OSI=90%, 8-oxodG/kreatinin=87%), te se mogu koristiti za procenu oksidativnog stresa kod pacijenata sa HOBP-om.
13. Genske varijante: CYP1A1 \*1A/\*2A, GSTM1 \*nulti, GSTT1 \*nulti, GSTP1 Ile105Val, mEPHX S i F, gena uključenih u metabolizam ksenobiotika, ne predstavljaju pojedinačne faktore rizika za nastanak HOBP.
14. Povećana učestalost GSTM1 \*nultog genotipa u populaciji pacijenta pušača ukazuje na udruženost ovog genotipa sa sredinskim faktorom rizika, pušenjem, u nastanku HOBP-a.
15. Distribucije kombinovanih genotipova GSTM1, GSTT1 i mEPHX gena, nisu se razlikovale između kontrole i pacijenata. Međutim, složeni GSTM1/GSTT1 genotip sa bar jednom delecijom predstavlja visok faktor rizika za nastanak HOBP, samo u ženskoj populaciji.
16. Kod zdravih žena učestalost složenog genotipa sa bar jednom delecijom GSTM1/GSTT1 gena je bila značajno niža u odnosu na muškarce, a ova polna razlika je bila veća u populaciji pušača.
17. Uočen je trend povećane učestalosti složenog genotipa koji su činili prisustvo mEPH niska aktivnost/GSTM1 \*nulti/GSTT1 \*nulti kod HOBP-pacijenata u

odnosu na kontrolnu grupu, a složeni genotip koji su činili prisustvo mEPH niska aktivnost/GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus je pokazao tendenciju zaštitnog faktora za pojavu HOBP.

18. Visok nivo sistemskog oksidativnog stresa (povišen 8-oxodG/kreatinin u urinu) i prisustvo GSTP1 105Val alela, genske varijante sa niskom mEPH enzimskom aktivnošću ili složenog genotipa GSTM1 \*plus/GSTT1 \*plus/mEPH niske enzimske aktivnosti bili su povezani sa pojavom HOBP-a, posebno u populaciji nepušača.
19. Faktori rizika za najveće smanjenje funkcije pluća kod osoba koje su nosioci fenotipa mEPH sa niskom aktivnošću su teško pušenje (paklo/godine > 30) i visok nivo oksidativnog stresa (urinarni 8-oxodG/kreatinin > 3,5 nmol/mmol).
20. Povišen oksidativni stres (procenjen kao OSI ili 8-oxodG/kreatinin), starenje, inflamacija (povišeni leukociti), kumulativno dejstvo duvanskog dima (paklo/godine), snižen BMI i prisustvo najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu predstavljaju nezavisne prediktore za nastanak HOBP u populaciji Srbije. U odnosu na pol, kod muškaraca starenje ostaje nezavisni prediktor, dok je kod žena pojava HOBP povezana sa težinom pušenja i prisustvom najmanje jedne delecije (GSTM1 \*nulti ili GSTT1 \*nulti) u složenom GSTM1/GSTT1 genotipu.

## 7. LITERATURA

1. GOLD (Global initiative for chronic obstructive lung diseases). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Updated 2018, <http://www.goldcopd.org>.
2. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152: 77–121.
3. Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papan A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I, Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015; 5(2): 020415.
4. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380(9859): 2095–2128.
5. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006; 3(11): e442.
6. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostifikovanje i lečenje hronične opstruktivne bolesti pluća. Beograd 2013. (dostupno na linku: <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/Novembar/VodicZaDijagnostifikovanjeiLecenjeHronicneOpstruktivneBolestiPluca.pdf>)
7. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*. 2004; 23: 932–946.
8. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005; 2(4): 258–266.
9. Roth M. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008; 12(4): 375–380.

10. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, De Rijck K, Reinartz SM, van Drunen CM, Verleden GM, Vermassen FE, Joos GF, Brusselle GG. Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respir Res.* 2010; 11: 35.
11. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34(8): 1156–1167.
12. Donnelly LE, Barnes PJ. Chemokine receptors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27(10): 546–553.
13. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153(2): 530–534.
14. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, Nishimura M. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax.* 2002; 57(5): 405–411.
15. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 2014; 35(1): 71–86.
16. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J.* 2008; 31(6): 1334–1356.
17. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26(5): 602–609.
18. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J.* 2001; 17(5): 946–953.
19. Cavalcante AG, de Bruin PF. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pneumol.* 2009; 35(12): 1227–1237.

20. McGuinness AJ, Sapey E. Oxidative stress in COPD: Sources, Markers, and Potential Mechanisms. *J Clin Med*. 2017; 6(2).
21. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 686: 12–27.
22. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*. 1996; 16: 33–50.
23. Jiménez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Duffin R, Drost EM, Hay RT, Donaldson K, MacNee W. Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000; 166(2): 101–110.
24. Chung KF. P-38 mitogen-activated protein kinase pathways in asthma and COPD. *Chest*. 2011; 139(6): 1470–1479.
25. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*. 2009; 373(9678): 1905–1917.
26. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2005; 352(19): 1967–1976.
27. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162(2):701–706.
28. Kirkham PA, Caramori G, Casolari P, Papi AA, Edwards M, Shamji B, Triantaphyllopoulos K, Hussain F, Pinart M, Khan Y, Heinemann L, Stevens L, Yeadon M, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 184(7): 796–802.
29. Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, Milne JC, Ito M, Rossios C, Elliot M, Hogg J, Kharitonov S, Goto H, Bemis JE, Elliott P, Barnes PJ, Ito K. A protein deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9. *FASEB J*. 2009; 23(9): 2810–2819.



30. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, Sarni M, Housset B, Weitzenblum E, Matart M, Le Corvoisier P, Rideau D, Boczkowski J, Dubois-Rande JL, Chouaid C, Adnot S. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009; 179(7): 566–571.
31. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009; 27(2): 120–139.
32. Cooke MS, Olinski R, Loft S, ESCULA. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(1): 3–14.
33. Hayakawa H, Taketomi A, Sakumi K, Kuwano M, Sekiguchi M. Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry.* 1995; 34(1): 89–95.
34. Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, Sancar A. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(17): 9463–9468.
35. Bessho T, Tano K, Kasai H, Ohtsuka E, Nishimura S. Evidence for two DNA repair enzymes for 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *J Biol Chem.* 1993; 268(26): 19416–19421.
36. Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(5): 891–937.
37. Evans MD, Saparbaev M, Cooke MS. DNA repair and the origins of urinary oxidized 2'-deoxyribonucleosides. *Mutagenesis.* 2010; 25(5): 433–442.
38. Lee KF, Chung WY, Benzie IFF. Urine 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), a specific marker of oxidative stress, using direct, isocratic LC-MS/MS: Method evaluation and application in study of biological variation in healthy adults. *Clin Chim Acta.* 2010; 411(5-6): 416–422.
39. European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis, Evans MD, Olinski R, Loft S, Cooke MS. Toward consensus in the analysis of urinary 8-

- oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *FASEB J.* 2010; 24(4): 1249–1260.
40. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(2): 801–808.
41. Wailkar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2010; 78(5): 486–494.
42. Mesaros C, Arora JS, Wholer A, Vachani A, Blair IA. 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine as a biomarker of tobacco-smoking-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(3): 610–617.
43. Neofytou E, Tzortzaki EG, Chatziantoniou A, Saifakas NM. DNA damage due to oxidative stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Int J Mol Sci.* 2012; 13(12): 16853–16864.
44. Tzortzaki EG, Dimakou K, Neofytou E, Tsikritsaki K, Samara K, Avgousti M, Amargianitakis V, Gousiou A, Menikou S, Siafakas NM. Oxidative DNA damage and somatic mutations: A link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airways diseases. *Chest.* 2012; 141(5): 1243–1250.
45. Yang S, Wu H, Zhao J, Wu X, Zhao J, Ning Q, Xu Y, Xie J. Feasibility of 8-OHdG formation and hOGG1 induction in PBMCs for assessing oxidative DNA damage in the lung of COPD patients. *Respirology.* 2014; 19(8): 1183–1190.
46. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283(2): 246–255.
47. Lin JL, Thomas PS. Current Perspectives of Oxidative Stress and its Measurement in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD.* 2010; 7(4): 291–306.
48. Mercado N, Thimmulappa R, Thomas CM, Fenwick PS, Chana KK, Donnelly LE, Biswal S, Ito K, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 406(2): 292–298.
49. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12): 1103–1111.

50. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37(4): 277–285.
51. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol.* 2005; 100(1): 61–64.
52. Sharma A, Singh J, Kajal NC, Malhotra B, Chandey M, Kamboj SS, Kaur M. Effect of smoking status, disease severity, exacerbations on Oxidative stress and hs-CRP levels in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Human Biology Review.* 2016; 5(3): 309–320.
53. Ekin S, Arisoy A, Gunbatar H, Sertogullarindan B, Sunnetcioglu A, Sezen H, Asker S, Yildiz H. The relationships among the levels of oxidative and antioxidative parameters, FEV1 and prolidase activity in COPD. *Redox Rep.* 2017; 22(2): 74–77.
54. Yang KY, Su VY. Serum oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *J Chin Med Assoc.* 2015; 78(12): 687–688.
55. Mohamed NA, El-Deek SEM, Makhlof HA, Ahmed Y, El-Metwaly T. Role of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor and total antioxidant capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Med J Cairo Univ.* 2015; 83(1): 435–441.
56. Ambade V, Sontakke A, Basannar D. Total antioxidant capacity: Correlation with other antioxidants and clinical utility of their levels in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Biochem Res Rev.* 2014; 4(2): 150–162.
57. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res.* 2012; 91(2): 142-149.
58. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35(1): 155–168.
59. Cook DG, Strachan DP. Health effects of passive smoking. 3. Parental smoking and prevalence of respiratory symptoms and asthma in school age children. *Thorax.* 1997; 52(12): 1081–1094.

60. Jarvis M, Tunstall-Pedoe H, Feyerabend C, Vesey C, Sallojee Y. Biochemical markers of smoke absorption and self reported exposure to passive smoking. *J Epidemiol Community Health*. 1984; 38(4): 335–339.
61. Berny C, Boyer JC, Capolaghi B, De L'Homme G, Desch G, Garelik D, Hayder R, Houdret N, Jacob N, Koskas T, Lainé G, Le Moel G, Moulisma M, Plantin-Carrenard E, Venembre P. Biomarkers of tobacco smoke exposure. *Ann Biol Clin*. 2002; 60(3): 263–272.
62. Robinson DE, Balter NJ, Schwartz SL. A physiologically based pharmacokinetic model for nicotine and cotinine in man. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1992; 20(6): 591–609.
63. Ashton H, Stepney R, Thompson JW. Should intake of carbon monoxide be used as a guide to intake of other smoke constituents?. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981; 282(6257): 10–13.
64. Pojer R, Whitfield JB, Poulos V, Eckhard IF, Richmond R, Hensley WJ. Carboxyhemoglobin, cotinine, and thiocyanate assay compared for distinguishing smokers from non-smokers. *Clin Chem*. 1984; 30(8): 1377–1380.
65. Haufroid V, Lison D. Urinary cotinine as a tobacco-smoke exposure index: a minireview. *Int Arch Occup Environ Health*. 1998; 71(3): 162-168.
66. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P 3rd. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*. 2009; (192): 29-60.
67. Chan-Yeung M, Dimich-Ward H. Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke. *Respirology*. 2003; 8(2): 131-139.
68. Knight GJ, Palomaki GE, Lea DH, Haddow JE. Exposure to environmental tobacco smoke measured by cotinine, 125I-radioimmunoassay. *Clin Chem*. 1989; 35(6): 1036-1039.
69. Kim H, Lim Y, Lee S, Park S, Kim C, Hong C, Shin D. Relationship between environmental tobacco smoke and urinary cotinine levels in passive smokers at their residence. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2004; 14(1): 65–70.
70. Rabbaa-Khabbaz L, Abi Daoud R, Karam-Sarkis D. A simple, sensitive, and rapid method for the determination of cotinine in urine by high-performance

- liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr Sci.* 2006; 44(9): 535–538.
71. Løkke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax.* 2006; 61(11): 935–939.
  72. Jones MC, Thomas GO. Alpha antitrypsin deficiency and pulmonary emphysema. *Thorax.* 1971; 26(6): 652–662.
  73. Mazodier P, Orell SR, Siken L, Svanborg N. Constitutional deficiency alpha 1 antitrypsin and panlobular emphysema (report of 24 autopsies). *J Fr Med Chir Thorac.* 1971; 25(1): 5–32.
  74. Castell JV, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol.* 2005; 57(1): 189–204.
  75. Ortiz de Montellano PR. Role of cytochrome P450 enzymes in biotransformation. *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics*, First Edition, 2014.
  76. Landi MT, Bertazzi PA, Shields PG, Clark G, Lucier GW, Garte SJ, Cosma G, Caporaso NE. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans. *Pharmacogenetics.* 1994; 4(5): 242–246.
  77. Vibhuti A, Arif E, Mishra A, Deepak D, Singh B, Rahman I, Mohammad G, Pasha MA. CYP1A1, CYP1A2 and CYBA gene polymorphisms associated with oxidative stress in COPD. *Clin Chim Acta.* 2010; 411(7–8): 474–480.
  78. Yang L, Li F, Yan M, Su X. Association of the CYP1A1 MspI and TNF $\alpha$ -308 polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in Inner Mongolia. *Genet Mol Res.* 2014; 13(2): 3209–3217.
  79. Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, Madhavan J, Devac SC, Ankathil R. Possible risk modification by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms in lung cancer susceptibility in a South Indian population. *J Hum Genet.* 2005; 50(12): 618–627.
  80. Cheng SL, Yu CJ, Yang PC. Genetic polymorphisms of cytochrome p450 and matrix metalloproteinase in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Genet.* 2009; 47(7–8): 591–601.

81. Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet Mol Biol.* 2004; 27(2): 133–138.
82. Honma HN, De Capitani EM, Barbeiro Ade S, Costa DB, Morcillo A, Zambon L. Polymorphism of the CYP1A1\*2A gene and susceptibility to lung cancer in a Brazilian population. *J Bras Pneumol.* 2009; 35(8): 767–772.
83. Václavíková R, Hughes DJ, Souček P. Microsomal Epoxide Hydrolase 1 (EPHX1): Gene, Structure, Function, and Role in Human Disease. *Gene.* 2015; 571(1): 1–8.
84. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet.* 1994; 3(3): 421–428.
85. Park JY, Chen L, Wadhwa N, Tockman MS. Polymorphisms for microsomal epoxide hydrolase and genetic susceptibility to COPD. *Int J Mol Med.* 2005; 15(3): 443–448.
86. Židzik J, Slabá E, Joppa P, Kluchová Z, Dorková Z, Skyba P, Habalová V, Šalagovič J, Tkáčová R. Glutathione S-transferase and microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease in Slovak population. *Croat Med J.* 2008; 49(2): 182–191.
87. Chen CZ, Wang RH, Lee CH, Lin CC, Chang HY, Hsiue TR. Polymorphism of microsomal epoxide hydrolase is associated with chronic obstructive pulmonary disease and bronchodilator response. *J Med Assoc.* 2011; 685–689.
88. Xiao D, Wang C, Du MJ, Pang BS, Zhang HY, Xiao B, Liu JZ, Weng XZ, Su L, Christiani DC. Association between polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase (mEH) gene and chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003; 83(20): 1782–1786.
89. Penyige A, Poliska S, Csanky E, Scholtz B, Dezso B, Schmelczer I, Kilty I, Takacs L, Nagy L. Analyses of association between PPAR gamma and EPHX1 polymorphisms and susceptibility to COPD in a Hungarian cohort, a case-control study. *BMC Med Genet.* 2010; 11: 152.

90. Chappell S, Daly L, Morgan K, Guetta-Baranes T, Roca J, Rabinovich R, Lotya J, Millar AB, Donnelly SC, Keatings V, MacNee W, Stolk J, Hiemstra PS, Miniati M, Monti S, O'Connor CM, Kalsheker N. Genetic variants of microsomal epoxide hydrolase and glutamate-cysteine ligase in COPD. *Eur Respir J*. 2008; 32(4): 931–937.
91. Lee J, Nordestgaard BG, Dahl M. EPHX1 polymorphisms, COPD and asthma in 47,000 individuals and in meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011; 37(1): 18–25.
92. Li H, Fu WP, Hong ZH. Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphisms and risk of chronic obstructive pulmonary disease: A comprehensive meta-analysis. *Oncol Lett*. 2013; 5(3): 1022–1030.
93. Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res*. 1998; 58(23): 5291–5293.
94. Erkisi Z, Yaylim-Eraltan I, Turna A, Gormus U, Camlica H, Isbir T. Polymorphisms in the microsomal epoxide hydrolase gene: role in lung cancer susceptibility and prognosis. *Tumori*. 2010; 96(5): 756–763.
95. Hayes JD, Strange RC. Glutathione-S-transferase polymorphisms and their biological consequence. *Pharmacology*. 2000; 61(3): 154–166.
96. Seidegård J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson RW. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85(19): 7293–7297.
97. Shukla RK, Kant S, Bhattacharya S, Mittal B. Association of genetic polymorphism of GSTT1, GSTM1 and GSTM3 in COPD patients in a north Indian population. *COPD*. 2011; 8(3): 167–172.
98. Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, Yang PC. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J*. 2004; 23(6): 818–824.
99. Faramawy MM, Mohammed TO, Hossaini AM, Kashem RA, Abu Rahma RM. Genetic polymorphism of GSTT1 and GSTM1 and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Crit Care*. 2009; 24(3): 7–10.

100. Mehrotra S, Sharma A, Kumar S, Kar P, Sardana S, Sharma JK. Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1 gene LOCI in COPD. *Int J Immunogenet.* 2010; 37(4): 263–267.
101. Imboden M, Downs SH, Senn O, Matyas G, Brandli O, Russi EW, Schindler C, Ackermann-Lieblich U, Berger W, Probst-Hensch NM; SAPALDIA Team. Glutathione-S-transferase genotypes modify lung function decline in the general population: SAPALDIA cohort study. *Respir Res.* 2007; 8: 2.
102. Hu X, Ji X, Srivastava SK, Xia H, Awasthi S, Nanduri B, Awasthi YC, Zimniak P, Singh SV. Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione-S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 345(1): 32–38.
103. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1999; 54(8): 693–696.
104. Calikoglu M, Tamer L, Ates AN, Karakaş S, Ercan B. The association between polymorphic genotypes of glutathione S-transferases and COPD in the Turkish population. *Biochem Genet.* 2006; 44(7–8): 307–319.
105. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Tselousova OS, Zagidullin ShZ, Viktorova TV. Polymorphism of the genes for antioxidant defense enzymes and their association with the development of chronic obstructive pulmonary disease in the population of Bashkortostan. *Genetika.* 2009; 45(7): 967–976.
106. Lakhdar R, Denden S, Knani J, Leban N, Daimi H, Hassine M, Lefranc G, Ben Chibani J, Haj Khelil A. Relationship between glutathione S-transferase P1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease in a Tunisian population. *Genet Mol Res.* 2010; 9(2): 897–907.
107. Vibhuti A, Arif E, Deepak D, Singh B, Qadar Pasha MA. Genetic polymorphisms of GSTP1 and mEPH correlate with oxidative stress markers and lung function in COPD. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 359(1): 136–142.



108. Yan F, Chen C, Jing J, Li W, Shen H, Wang X. Association between polymorphism of glutathione S-transferase P1 and chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Respir Med.* 2010; 104(4): 473–480.
109. Yang L, Li X, Tong X, Fan H. Association between glutathione S-transferase P1 Ile(105)Val gene polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis based on seventeen case-control studies. *Meta Gene.* 2015; 6: 59–64.
110. Smolonska J, Wijmenga C, Postma DS, Boezen HM. Erratum: Meta-analyses on suspected chronic obstructive pulmonary disease genes: a summary of 20 years' research. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 181(7): 765.
111. Molfino NA, Coyle AJ. Gene-environment interactions in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2008; 3(3): 491–497.
112. Agusti A, Celli B, Faner R. What does andotyping mean for treatment in chronic obstructive pulmonary disease? *Lancet.* 2017; 390(10098): 980–987.
113. Stoller JK, Snider GL, Brantly ML, Fallat RJ, Stockley RA, Turino GM, Konietzko N, Dirksen A, Eden E, Fallat R, Luisetti M, Stolk J, Strange C, American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/ European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Pneumologie.* 2005; 59(1): 36–68.
114. Song N, Tan W, Xing D, Lin D. CYP 1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis.* 2001; 22(1): 11–16.
115. Sandford AJ, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(2): 469–473.
116. Tilak AR, Kumar S, Jain M, Pant MC, Das BC, Guleria R, Mittal B, Mathur N, Kumar A. Association of functionally important polymorphism of microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1) with lung cancer susceptibility. *Cancer Invest.* 2011; 29(6): 411–418.

117. Lee J, Dahl M, Nordestgaard BG. Genetically lowered microsomal epoxide hydrolase activity and tobacco-related cancer in 47,000 individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20(8): 1673–1682.
118. Dey T, Gogoi K, Unni BG, Kalita M, Bharadwaz M, Bhattacharjee M, Boruah PK, Bora T, Ozah D, Kalita M. Role of glutathione S transferase polymorphism in COPD with special reference to peoples living in the vicinity of the open cast coal mine of Assam. *PLoS One.* 2014; 9(5): e96739.
119. Tzortzaki EG, Siafakas NM. Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur Respir Mon.* 2006; 38: 84–99.
120. Baranova H, Perriot J, Albuissou E, Ivaschenko T, Baranov VS, Hemery B, Mouraire P, Riou N, Malet P. Peculiarities of the GSTM 0/0 genotype in French heavy smokers with various types of Chronic Bronchitis. *Hum Genet.* 1997; 99(6): 822–826.
121. He JQ, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166(3): 323–328.
122. GOLD (Global initiative for chronic obstructive lung diseases). Pocket guide to COPD diagnosis, management and prevention. Updated 2015, <http://www.goldcopd.org>.
123. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques.* 1991; 11(3): 298–300,302.
124. Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the hemebinding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem.* 1991; 110(3): 407–411.
125. Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J, Jäger E, Fuchs J, Winkler L, Oesch F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem.* 1996; 236: 184–186.

126. Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet*. 1997; 350 (9078): 630–633.
127. Bartlett JMS, Stirling D. *PCR Protocols*: Springer; 2003.
128. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
129. Radojkovic D, Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clin Chem*. 2000; 46(6): 883–884.
130. Hosmer DW, Lemeshow S. *Assessing the fit of the model. Applied logistic regression*. NY John Wiley and Sons. 2000; 160–164.
131. MacNee. Oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Monograph*. 2006; 1: 100–129.
132. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 2009; 14(1): 27–38.
133. Tavalani H, Nadi E, Karimi J, Taghi M, Goodarzi MT. Oxidative stress in COPD patients, smokers, and non-smokers. *Respir Care*. 2012; 57(12): 2090–2094.
134. 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. *Respir Med*. 2011; 105(1): 31–37.
135. Deslee G, Woods JC, Moore C, Conradi SH, Gierada DS, Atkinson JJ, Battaile JT, Liu L, Patterson GA, Adair–Kirk TL, Holtzman MJ, Pierce RA. Oxidative damage to nucleic acids in severe emphysema. *Chest*. 2009; 135(4): 965–974.
136. Yoshida T, Tudor RM. Pathobiology of cigarette smoke–induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev*. 2007; 87(3): 1047–1082.
137. Jung S, Lee IS, Kim SB, Moon CS, Jung JY, Kang YA, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Kim EY. Urine cotinine for assessing tobacco smoke exposure in Korean: Analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES). *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2012; 73(4): 210–218.
138. Emin S, Yordanova K, Dimov D, Ilieva V, Koychev A, Prakova G, Vlaykova T. Total antioxidant capacity of plasma determined as ferrous reducing ability of plasma in patients with COPD. *Trakia J Sci*. 2010; 8(2): 205–213.

139. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154(4): 1055–1060.
140. Ceylan E, Gencer M, Uzer E, Celik H. Measurement of the total antioxidant potential in chronic obstructive pulmonary diseases with a novel automated method. *Saudi Med J*. 2007; 28(9): 1339–1343.
141. Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, Lam TH, Lam KH, Miller MR, Zhang WS, Thomas GN, Adab P. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Lancet*. 2007; 370(9589): 751–757.
142. Sin DD, Cohen SB, Day A, Coxson H, Pare´ PD. Understanding the biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women. *Proc Am Thorac Soc*. 2007; 4(8): 671–674.
143. Caramori G, Adcock IM, Casolari P, Ito K, Jazrawi E, Tsaprouni L, Villetti G, Civelli M, Carnini C, Chung KF, Barnes PJ, Papi A. Unbalanced oxidant–induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax*. 2011; 66(6): 521–527.
144. Prieme´ H, Loft S, Klarlund M, Grønbaek K, Tønnesen P, Poulsen HE. Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8–oxo–7,8–dihydro–2'–deoxyguanosine excretion. *Carcinogenesis*. 1998; 19(2): 347–351.
145. Rodriguez J, Jiang R, Johnson WC, MacKenzie BA, Smith LJ, Barr RG. The association of pipe and cigar use with cotinine levels, lung function, and airflow obstruction: a cross–sectional study. *Ann Intern Med*. 2010; 152(4): 201–210.
146. Salvi S. Tobacco smoking and environmental risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2014; 35(1): 17–27.
147. Vasankari T, Jousilahti P, Knekt P, Marniemi J, Heistaro S, Lppo K, Heliovaara M. Serum cotinine predicts bronchial obstruction regardless of self–reported smoking history. *Scand J Public Health*. 2011; 39(5): 547–552.
148. Sørheim IC, Johannessen A, Gulsvik A, Bakke PS, Silverman EK, DeMeo DL. Gender differences in COPD: are woman more susceptible to smoking effects than male? *Thorax*. 2010; 65(6): 480–485.

149. Salama RHM, Elkholy MM, Sadek SH, Mahdy IG. Total antioxidant capacity as a marker in predicting severity of chronic obstructive pulmonary diseases. *Egypt J Bronchol.* 2017; 11(4): 322–326.
150. Rahman I, Swarska E, Henry M, MacNee W. Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax.* 2000; 55(3): 189–193.
151. Singh S, Verma SK, Kumar S, Ahmad MK, Nischal A, Singh SK, Dixit RK. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in chronic obstructive pulmonary disease. *Scand J Immunol.* 2017; 85(2): 130–137.
152. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Altered oxidant–antioxidant levels in the disease prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013; 17(8): 1104–1109.
153. Can U, Yerlikaya FH, Yosunkaya S. Role of oxidative stress and serum lipid levels in stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Chin Med Assoc.* 2015; 78(12): 702–708.
154. Igishi T, Hitsuda Y, Kato K, Sako T, Burioka N, Yasuda K, Sano H, Shigeoka Y, Nakanishi H, Shimizu E. Elevated urinary 8–hydroxydeoxyguanosine, a biomarker of oxidative stress, and lack of association with antioxidant vitamins in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology.* 2003; 8(4): 455–460.
155. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2015; 763: 212–245.
156. Young RP, Hopkins RJ. Link between COPD and lung cancer. *Respir Med.* 2010; 104(5): 758–759.
157. Durham AL, Adcock IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer.* 2015; 90(2): 121–127.
158. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE. Oxidative DNA damage estimated by 8–hydroxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis.* 1992; 13(12): 2241–2247.
159. Mizoue T, Tokunaga S, Kasai H, Kawai K, Sato M, Kubo T. Body mass index and oxidative DNA damage: a longitudinal study. *Cancer Sci.* 2007; 98(8): 1254–1258.

160. Sakano N, Wang DH, Takahashi N, Wang B, Sauriasari R, Kanbara S, Sato Y, Takigawa T, Takaki J, Ogino K. Oxidative stress biomarkers and lifestyles in Japanese healthy people. *J Clin Biochem Nutr.* 2009; 44(2): 185–195.
161. Andreoli R, Mutti A, Goldoni M, Manini P, Apostoli P, De Palma G. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy)ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radic Biol Med.* 2011; 50(2): 254–261.
162. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax.* 2004; 59(7): 574–580.
163. Koo HK, Kang HK, Song P, Park HK, Lee SS, Jung H. Systemic white blood cell count as a biomarker associated with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Tuberc Respir Dis (Seoul).* 2017; 80(3): 304–310.
164. Su B, Liu T, Fan H, Chen F, Ding H, Wu Z, Wang H, Hou S. Inflammatory markers and the risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *PloS One.* 2016; 11(4): e0150586.
165. Fattouh M, Alkady O. Inflammatory biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Egypt J Chest Dis Tuberc.* 2014; 63(4): 799–804.
166. Similowski T, Agusti A, MacNee W, Schönhofer B. The potential impact of anaemia of chronic disease in COPD. *Eur Respir J.* 2006; 27(2): 390–396.
167. John M, Hoernig S, Doehner W, Okonko DD, Witt C, Anker SD. Anemia and inflammation in COPD. *Chest.* 2005; 127(3): 825–829.
168. Sarkar M, Rajta PN, Khatana J. Anemia in chronic obstructive pulmonary disease: Prevalence, pathogenesis, and potential impact. *Lung India.* 2015; 32(2): 142–151.
169. Yohannes AM, Ershler WB. Anemia in COPD: a systematic review of the prevalence, quality of life, and mortality. *Respir Care.* 2011; 56(5): 644–652.
170. Robalo Nunes A, Tátá M. The impact of anemia and iron deficiency in chronic obstructive pulmonary disease: A clinical overview. *Rev Port Pneumol.* 2017; 23(3): 146–155.
171. Park JH, Sheen S, Lee JS, Oh YM, Lee JH, Yoo KH, Yoon H, Lee SD. Anemia in COPD patients of Korean obstructive lung disease (KOLD) cohort. *Eur Respir J.* 2015; 46 (suppl 59) PA2308.

172. Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension*. 2001; 37(2): 381–385.
173. Morlá M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W, Agustí AG. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J*. 2006; 27(3): 525–528.
174. Boyer L, Chouaïd C, Bastuji–Garin S, Marcos E, Margarit L, Le Corvoisier P, Vervoitte L, Hamidou L, Frih L, Audureau E, Covali–Noroc A, Andujar P, Saakashvili Z, Lino A, Ghaleh B, Hue S, Derumeaux G, Housset B, Dubois–Randé JL, Boczkowski J, Maitre B, Adnot S. Aging–related systemic manifestations in COPD patients and cigarette smokers. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0121539.
175. Gan WQ, Man SF, Postma DS, Camp P, Sin DD. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta–analysis. *Respir Res*. 2006; 7(1): 52.
176. Hakim IA, Harris R, Garland L, Cordova CA, Mikhael DM, Sherry Chow HH. Gender difference in systemic oxidative stress and antioxidant capacity in current and former heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012; 21(12): 2193–2200.
177. Valvi D, Mannino DM, Müllerova H, Tal–Singer R. Fibrinogen, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and outcomes in two United States cohorts. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2012; 7: 173–182.
178. Müller B, Tamm M. Biomarkers in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: among the blind, the one–eyed is king. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174(8): 848–849.
179. Lee SJ, Lee HR, Lee TW, Ju S, Lim S, Go SI, You JW, Cho YJ, Lee GW, Jeong YY, Kim HC, Lee JD. Usefulness of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a prospective observational study. *Korean J Intern Med*. 2016; 31(5): 891–898.

180. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene. *FEBS Lett.* 1990; 263(1): 131–133.
181. Cantlay AM, Lamb D, Gillooly M, Norrman J, Morrison D, Smith CAD, Harrison DJ. Association between the CYP1A1 gene polymorphism and susceptibility to emphysema and lung cancer. *Clin Mol Pathol.* 1995; 48(4): 210–214.
182. Budhi A, Hiyama K, Isobe T, Oshima Y, Hara H, Maeda H, Kohno N. Genetic susceptibility for emphysematous changes of the lung in Japanese. *Int J Mol Med.* 2003; 11(3): 321–329.
183. Yim JJ, Park GY, Lee CT, Kim YW, Han SK, Shim YS, Yoo CG. Genetic susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Koreans: combined analysis of polymorphic genotypes for microsomal epoxide hydrolase and glutathione S–transferase M1 and T1. *Thorax.* 2000; 55(2): 121–125.
184. Matheson MC, Raven J, Walters EH, Abramson MJ, Ellis JA. Microsomal epoxide hydrolase is not associated with COPD in a community–based sample. *Hum Bio.* 2006; 78(6): 705–717.
185. Komiya Y, Tsukino H, Nakao H, Kuroda Y, Imai H, Katoh T. Human glutathione S–transferase A1, T1, M1, and P1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005; 131: 238–242.
186. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Ferreira P, Lobo F, Morais A, Oliveira J, Lopes C. Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S–transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Prostate.* 2004; 58(4): 414–420.
187. Harrison DJ, Cantlay AM, Rae F, Lamb D, Smith C. Frequency of glutathione S–transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol.* 1997; 16(7): 356–360.
188. Cao T, Xu N, Wang Z, Liu H. Effects of glutathione S–transferase gene polymorphisms and antioxidant capacity per unit albumin on the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2017.



189. Piacentini S, Polimanti R, Porreca F, Martínez–Labarga C, De Stefano GF, Fuciarelli M. GSTT1 GSTM1 gene polymorphisms in European and African populations. *Mol Biol Rep.* 2011; 38(2): 1225–1230.
190. Hersh CP, Demeo DL, Lange C, Litonjua AA, Reilly JJ, Kwiatkowski D, Laird N, Sylvia JS, Sparrow D, Speizer FE, Weiss ST, Silverman EK. Attempted replication of reported chronic obstructive pulmonary disease candidate gene associations. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; 33(1): 71–78.
191. Chan–Yeung M, Ho SP, Cheung AHK, So LKY, Wong PC, Chan KK, Chan WM, Ip MSM, Mak JCW. Polymorphisms of glutathione S–transferase genes and functional activity in smokers with or without COPD. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11(5): 508–514.
192. Tam A, Morrish D, Wadsworth S, Dorscheid D, Paul Man SF, Sin DD. The role of female hormones on lung function in chronic lung disease. *BMC Womens Health.* 2011; 11: 24.
193. Korytina GF, Yanbaeva DG, Babenkova LI, Etkina EI, Victorova TV. Genetic polymorphisms in the cytochromes P–450 (1A1, 2E1), microsomal epoxide hydrolase and glutathione S–transferase M1, T1, and P1 genes, and their relationship with chronic bronchitis and relapsing pneumonia in children. *J Mol Med.* 2005; 83(9): 700–710.
194. Gandhi G, Kaur G. Oxidative DNA damage, oxidative stress and genetic susceptibility–prognostic scores in ‘missing’ COPD cases. *Int J Hum Genet.* 2015; 15(3): 97–119.

## BIOGRAFIJA

Živka Malić je rođena 21.09.1988. godine u Bijeljini. Srednju medicinsku školu je završila u Bijeljini. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu, smer magistar farmacije 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,73. Obavezan staž za magistre farmacije obavila je u zdravstvenoj ustanovi Apoteka „NINA-1” u Bijeljini, a stručni ispit je položila u junu 2013. godine. Školske 2012/13. upisala je doktorske akademske studije, modul: Medicinska biohemija. Od septembra 2012. godine zaposlena je na „Univerzitetu Bijeljina”, u Bijeljini, kao asistent na Katedri za medicinsku biohemiju. Od početka rada na Katedri za medicinsku biohemiju učestvuje u pripremi i izvođenju praktične nastave iz predmeta: Opšta biohemija i Medicinska biohemija. U oktobru 2017. godine izabrana je u zvanje Višeg asistenta na Katedri za medicinsku biohemiju. Kao autor i koautor objavila je ukupno 3 rada. Dva rada su objavljena u međunarodnim časopisima kategorije M22, dok je jedan rad objavljen u međunarodnom časopisu kategorije M23.

Spisak objavljenih publikacija:

1. Topic A, **Malić Z**, Francuski Dj, Stankovic M, Markovic B, Soskic B, Tomic B, Ilic S, Dobrivojevic S, Drca S, Radojkovic D. Gender-related differences in susceptibility to oxidative stress in healthy middle-aged Serbian adults. *Biomarkers*. 2016; 21(2): 186-193. (M22, impakt faktor: 2.016);
2. Topic A, Nagorni-Obradovic Lj, Francuski Dj, Ljujic M, **Malić Z**, Radojkovic D. Oxidative Stress and Polymorphism of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Two Patients with Severe Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. *Biochemical Genetics*. 2016; 54(5): 746-752. (M23, impakt faktor: 1.927);
3. **Malić Z**, Topic A, Francuski Dj, Stankovic M, Nagorni-Obradovic Lj, Markovic B, Radojkovic D. Oxidative Stress and Genetic Variants of Xenobiotic-Metabolising Enzymes Associated with COPD Development and Severity in Serbian Adults. *COPD*. 2017; 14(1): 95-104. (M22, impakt faktor: 2.160).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Живка Д. Малић

Број индекса 30/12

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Фактори ризика за настанак и развој хроничне опструктивне болести плућа  
повезани са оксидативним стресом у популацији Србије**

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

Потпис аутора

У Београду, 06.07.2018.

*Živka Malić*

---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Живка Д. Малић

Број индекса 30/12

Студијски програм Докторске академске студије; модул: Медицинска биохемија  
Фактори ризика за настанак и развој хроничне опструктивне болести

Наслов рада плућа повезани са оксидативним стресом у популацији Србије

Ментор Проф. Др Александра Топић и Др Ђорђе Француски

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 06.07.2018.

*Živka Malic'*

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

### Фактори ризика за настанак и развој хроничне опструктивне болести плућа повезани са оксидативним стресом у популацији Србије

која је моје ауторско дело.

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

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

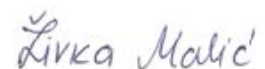
1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 06.07.2018.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.