



UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Vera R. Milovanović

**ZNAČAJ ALFA-1-ANTITRIPSINA I
METIONIN SULFOKSID REDUKTAZE A U
NASTANKU I PROGRESIJI HRONIČNE
OPSTRUKTIVNE BOLESTI PLUĆA U
POPULACIJI SRBIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.



UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Vera R. Milovanović

**THE IMPORTANCE OF ALPHA-1-
ANTITRYPSIN AND METHIONINE
SULFOXIDE REDUCTASE A IN THE ONSET
AND PROGRESSION OF CHRONIC
OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE IN
THE POPULATION OF SERBIA**

Doctoral disertation

Belgrade, 2024.

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju, Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, Laboratoriji za medicinsko biohemijske analize Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu i Institutu za medicinsku biohemiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Mentori:

Prof. dr Aleksandra Topić
Redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Aleksandra Divac Rankov
Viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Snežana Jovičić, Docent
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Neda Milinković, Docent
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Zorica Lazić, Redovni profesor u penziji
Univerzitet u Kragujevcu-Medicinski fakultet

Dr sc. Mila Ljujić, Viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu-
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem Prof. Dr Aleksandri Topić, na ukazanom poverenju, podršci, posvećenom vremenu, strpljenju i nesebičnoj pomoći i savetima tokom kompletne izrade ove doktorske disertacije.

Iskreno se zahvaljujem svom drugom mentoru Dr sc. Aleksandri Divac Rankov na izuzetnoj posvećenosti i predanosti tokom eksperimentalne faze rada, a takođe i na prijateljskim savetima, razumevanju i podršci tokom pisanja teze.

Dr sc. Nedi Milinković zahvaljujem na velikoj pomoći pri realizaciji eksperimentalnog dela rada i na korisnim savetima.

Prof. dr Zorici Lazić zahvaljujem se na svesrdnoj podršci i ukazanom poverenju.

Dr sc. Mili Ljujić hvala na iskrenoj pomoći i posvećenosti.

Za nesebično pruženu pomoć tokom eksperimentalnog dela doktorske disertacije zahvaljujem se profesorima, asistentima i tehničarima katedre za Biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Laboratoriji za medicinsko - biohemijske analize Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Svim članovima laboratorije za molekularnu biologiju, Insituta za molekularnu genetiku i genetički inženjering, Univerziteta u Beogradu, zahvaljujem se na savetima i pomoći tokom eksperimentalnog rada, a posebno na divnoj atmosferi tokom saradnje.

Iskrenu zahvalnost dugujem svojoj kolegini i prijateljici, Mariji Vasić sa Insituta za biohemiju Vojnomedicinske akademije, na saradnji tokom eksperimentalne faze i na neizmernoj podršci tokom svih godina rada na izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svim članovima Komisije za ocenu doktorske disertacije na konstruktivnim komentarima i pomoći.

Hvala mojoj deci, Đorđu i Dunji, na zagrljajima, osmesima, ljubavi i na pogledima punim razumevanja.

Neizmerno hvala mom suprugu Milošu, koji mi je bio apsolutna podrška i pokretačka snaga, koji je nesebično učestvovao u svim etapama izrade doktorske disertacije nesumnjivo verujući u mene, koji je u svakom trenutku bio pun razumevanja kao i uteha u najtežim trenucima tokom proteklih godina.

Hvala mojim roditeljima, Nadici i Raši, i mojoj sestri Vesni što su bili uz mene i verovali u mene.

Značaj alfa-1-antitripsina i metionin sulfoksid reduktaze A u nastanku i progresiji hronične opstruktivne bolesti pluća u populaciji Srbije

Rezime

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) se ispoljava postojanjem opstrukcije disajnih puteva, koja nastaje zbog abnormalnosti u disajnim putevima i/ili alveolama, najčešće uzrokovanih izlaganju štetnim česticama i gasovima. Razvoj HOBP je posledica udruženog dejstva više faktora koji mogu biti egzogeni (duvanski dim, zagađenje vazduha u zatvorenom ili otvorenom prostoru, profesionalna izloženost i socioekonomski status) i endogeni (genetički faktori, godine i pol, poremećaj u rastu i razviću pluća, infekcije, astma i hronični bronhitis). Alfa-1-antitripsin (AAT) je pozitivan reaktant akutne faze i glavni inhibitor serin proteaza u cirkulaciji i za sada jedini dokazani genetički faktor rizika za nastanak HOBP. On inhibira neutrofilnu elastazu u donjem respiratornom traktu i štiti plućni parenhim od destrukcije. AAT je kodiran polimorfnim genom, pri čemu su nastale proteinske varijante klasifikovane na osnovu elektroforetske mobilnosti, a najučestalije su F (fast-brza), M (medium-srednje brza), S (slow-spora) i Z (very slow-vrlo spora). Deficijencija AAT (AATD) se najčešće javlja kod PiZZ homozigota, sa nivoom cirkulišućeg AAT svega 15% u odnosu na normalan nivo, kod PiMM varijanti. Sklonost prema oksidaciji aktivnog centra AAT, metionina na poziciji 358, takođe dovodi do stečene funkcionalne deficijencije AAT. Pokazano je da u reparaciji oksidovanih metioninskih ostataka AAT učestvuje metionin sulfoksid reduktaza A (MSRA) *in vitro*. Potencijalna povezanost MSRA i pojave HOBP zasniva se na sposobnosti MSRA da redukuje metionin sulfoksid, koji nastaje oksidacijom metionina u aktivnom centru AAT, pri čemu doprinosi obnavljanju njegove antielastazne aktivnosti.

U istraživanju je učestvovalo 155 pacijenata obolelih od hronične opstruktivne bolesti pluća, dok je kontrolnu grupu činilo 134 zdravih ispitanika. Ispitivanja koja je obuhvatila studija sprovedena su uz saglasnost ispitanika, uz odobrenje Etičkog komiteta za biomedicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta i prema principima Helsinške deklaracije. Spirometrijskim testovima su mereni parametri forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1) i forsirani vitalni kapacitet (FVC). Koncentracija AAT određivana je turbidimetrijskom metodom na automatskom analizatoru. Tripsin inhibitorni kapacitet (TIC) i elastaza inhibitorni kapacitet (EIC), mereni su kinetičkom metodom merenja enzimske aktivnosti na automatskom analizatoru, a odražavaju sposobnost AAT da inhibira elastazu i tripsin. Korišćenjem odgovarajućih jednačina dobijeni su parametri koji odražavaju

funkcionalnu aktivnost AAT, antielastazna i antitripsinska aktivnost, kao i specifična inhibitorna aktivnost AAT prema elastazi (SIA-elastaza) i specifična inhibitorna aktivnost AAT prema tripsinu (SIA-tripsin). Izoelektrofokusanjem na poliakrilamidnom gelu, pri gradijentu pH 4,2-4,9, identifikovani su fenotipovi AAT u uzorcima seruma ispitanika. Primenom kombinovane metode PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), identifikovane su varijante MSRA rs10903323 polimorfizma iz uzoraka pune krvi.

Koncentracija AAT kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike bila je značajno viša ($p < 0,001$). Studija je pokazala povišen nivo oksidacije AAT (u %, u g/L) kod HOBP pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($p = 0,034$; $p < 0,001$). Parametri funkcionalne aktivnosti AAT bili su značajno niži kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, SIA-elastaza ($p < 0,001$), SIA-tripsin ($p < 0,001$) i antitripsinska aktivnost ($p < 0,001$). Dobijene vrednosti za SIA-elastazu i SIA-tripsin su bile značajno niže kod pacijenata pušača nego pacijenata nepušača ($p = 0,045$, $p = 0,009$), dok je vrednost ukupnog AAT i oksidovanog AAT (g/L) bila značajno viša kod pacijenata koji su pušači u odnosu na nepušače ($p = 0,001$, $p = 0,026$). Pacijenti pušači sa GOLD3+4 stadijumom bolesti imali su značajno viši nivo oksidovanog AAT (%) u poređenju sa zdravim nepušačima ($p = 0,009$), zdravim pušačima ($p = 0,033$), u odnosu na GOLD2 pušače ($p = 0,22$) i u odnosu na GOLD3+4 nepušače ($p = 0,038$). Učestalost alela AAT je bila sledeća: Z alel u kontrolnoj grupi 1,6% i kod HOBP pacijenata 3,6%; S alel u kontrolnoj grupi 0,8% i kod HOBP pacijenata 1,9%; F alel u kontrolnoj grupi nije detektovan dok je kod pacijenata 0,6%. Frekvence analiziranih fenotipova u kontrolnoj grupi i kod HOBP pacijenata su odstupale od Hardy-Weinbergove (H-W) ravnoteže ($p = 0,001$ i $p < 0,001$, redom). Analizom razlika u ispitivanim parametrima kod nosilaca različitih fenotipova AAT dobijeno je u grupi HOBP-pacijenata značajno niža koncentracija AAT ($p = 0,021$) i antitripsinska aktivnost ($p = 0,006$) kod nosilaca deficijernih fenotipova (MS, MZ, SZ) u odnosu na nedeficijentne (MM, MF). U grupi HOBP pacijenata sa deficijntnim fenotipovima (MS, MZ, SZ), pušači su imali značajno nižu vrednost za SIA-elastazu i SIA-tripsin u odnosu na nepušače ($p = 0,009$; $p = 0,001$, redom). U grupi HOBP-pacijenata sa deficijntim AAT fenotipovima nivo oksidovanog AAT (g/L) je bio značajno viši kod pušača u odnosu na nepušače ($p = 0,014$). Učestalost alela MSRA rs10903323 je bila sledeća: A alel u kontrolnoj grupi 89,5% i A alel kod HOBP pacijenata 90,0%; G alel u kontrolnoj grupi 10,5% i G alel kod HOBP pacijenata 10,0%. Frekvence analiziranih varijanti MSRA rs10903323 polimorfizma u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata bile su u H-W ravnoteži ($p = 0,880$ i $p = 0,380$, redom). Ispitivanjem

povezanosti MSRA rs10903323 polimorfizma i pušenja, ovo istraživanje je pokazalo da u grupi pacijenata pušača nivo oksidovanog AAT (%) bio značajno viši kod heterozigota AG u odnosu na homozigote AA ($p=0,028$). Takođe, ova studija je pokazala da u grupi pacijenata pušača sa teškim oblikom bolesti (GOLD3+4) nosioci AG genotipa imaju viši nivo oksidovanog AAT (% , g/L) u odnosu na AA homozigotne nosioce.

SIA-elastaza, oksidovani AAT, deficijentni fenotipovi AAT (MS, MZ, SZ) i starost veća od 60 godina pokazali su se kao nezavisni prediktori za pojavu HOBP. Takođe, pušenje je, kao što je do sada poznato, i u našoj studiji potvrđeno kao nezavistan prediktor za HOBP. Značajno snižene vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina kod pacijenata muškog pola koji su pušači u odnosu na nepušače, ukazuje na udruženi efekat pola i pušenja na smanjenu funkcionalnu aktivnost AAT i veću sklonost pojavi i razvoju HOBP. Pokazano je da je prisustvo MSRA rs10903323 G alela, udruženog sa pušenjem, faktor rizika za povećanje nivoa oksidacije AAT.

Prevenција i rana dijagnostika HOBP su od značaja kod osoba sa porodičnom istorijom ove bolesti. Fenotipizacija AAT i genotipizacija MSRA rs10903323 su potencijalno klinički značajni za ranu identifikaciju osoba sa povećanim rizikom od pojave i razvoja HOBP, posebno u grupi pušača. Takođe, parametar funkcionalne aktivnosti AAT, SIA-elastaza i oksidovani AAT su potencijalni biomarkeri za pojavu HOBP, posebno kod pušača.

Ključne reči: Hronična opstruktivna bolest pluća, MSRA, polimorfizam, oksidovani AAT, specifična inhibitorna aktivnost AAT prema elastazi, specifična inhibitorna aktivnost AAT prema tripsinu, fenotip AAT.

The importance of alpha-1-antitrypsin and methionine sulfoxide reductase A in the onset and progression of chronic obstructive pulmonary disease in the population of Serbia

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease that is manifested by the existence of airway obstruction, which occurs due to abnormalities in the airways and/or alveoli, most often caused by exposure to harmful particles and gases. The development of COPD is the result of the combined action of several factors that can be exogenous (tobacco smoke, indoor or outdoor air pollution, occupational exposure and socioeconomic status) and endogenous (genetic factors, age and gender, lung growth and development disorder, infections, asthma and chronic bronchitis). Alpha-1-antitrypsin (AAT) is a positive acute phase reactant and a major inhibitor of circulating serine proteases, and so far the only proven genetic risk factor for COPD. It inhibits neutrophil elastase in the lower respiratory tract and protects the lung parenchyma from destruction. AAT is coded by polymorphic gene, and variants of protein are classified based on electrophoretic mobility, and the most common are F (fast), M (medium-fast), S (slow-slow) and Z (very slow-very slow). AAT deficiency (AATD) occurs most often in PiZZ homozygotes, with a circulating AAT level of only 15% compared to the normal level, in PiMM variants. A propensity for oxidation of the active site of AAT, methionine at position 358, also leads to an acquired functional deficiency of AAT. Methionine sulfoxide reductase A (MSRA) participates in the repair of oxidized methionine residues AAT *in vitro*. The potential connection between the MSRA gene polymorphism and the occurrence of COPD is based on the ability of MSRA to reduce methionine sulfoxide, which is formed by the oxidation of methionine in the active center of AAT, thereby contributing to the restoration of its antielastase activity.

Patients group consisted of 155 patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease, while the control group consisted of 134 healthy subjects. The tests included in the study were conducted with the consent of the subjects, with the approval of the Ethics Committee for Biomedical Research of the University of Belgrade-Faculty of Pharmacy and according to the principles of the Declaration of Helsinki. Forced expiratory volume in the first second (FEV1), forced vital capacity (FVC) parameters were measured by spirometric tests. AAT concentration was determined by the turbidimetric method on an automatic analyzer. Trypsin inhibitory

capacity (TIC) and elastase inhibitory capacity (EIC) were measured by the kinetic method of measuring enzymatic activity on an automatic analyzer and reflect the ability of AAT to inhibit elastase and trypsin. Using the appropriate equations, the parameters reflecting the functional activity of AAT, antielastase and antitrypsin activity, as well as SIA-elastase and SIA-trypsin were obtained. By isoelectrofocusing on a polyacrylamide gel, at a pH gradient of 4,2-4,9, AAT phenotypes were identified in the test subjects' serum samples. Using the combined PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) method, MSRA rs10903323 gene variants were identified from whole blood samples.

The concentration of AAT in patients compared to healthy subjects was significantly higher ($p < 0,001$). The study showed an elevated level of AAT oxidation (in %, in g/L) in COPD patients compared to controls ($p = 0,034$; $p < 0,001$). Parameters indicating the functional activity of AAT were significantly lower in patients compared to the control group, SIA-elastase ($p < 0,001$), SIA-trypsin ($p < 0,001$) and antitrypsin activity ($p < 0,001$). The values for SIA-elastase and SIA-trypsin were significantly lower in smoking patients than in non-smoking patients ($p = 0,045$, $p = 0,009$), while the value of total AAT and oxidized AAT (g/L) was significantly higher in smoking patients in compared to non-smokers ($p = 0,001$, $p = 0,026$). Smoking patients with GOLD3+4 disease stage had a significantly higher level of oxidized AAT (%) compared to healthy non-smokers ($p = 0,009$), healthy smokers ($p = 0,033$), compared to GOLD2 smokers ($p = 0,22$) and in compared to GOLD3+4 non-smokers ($p = 0,038$). The frequency of the AAT alleles was as follows: the Z allele in the control group was 1,6%, and in the COPD patients, it was 3,6%; the S allele in the control group was 0,8%, and in the COPD patients, it was 1,9%; F allele was not detected in control group while in patients group was at 0,6%. The frequencies of the analyzed phenotypes in the control group and in COPD patients deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0,001$ and $p < 0,001$, respectively). Analysis of the differences in the examined parameters in carriers of different AAT phenotypes showed that in the HOBP patient group, there was a significantly lower concentration of AAT ($p = 0,021$) and antitrypsin activity ($p = 0,006$) in carriers of deficient phenotypes (MS, MZ, SZ) compared to non-deficient ones (MM, MF). In the COPD patient group with deficient phenotypes (MS, MZ, SZ), smokers had significantly lower values for SIA-elastase and SIA-trypsin compared to non-smokers ($p = 0,009$; $p = 0,001$, respectively). In the HOBP patient group with deficient AAT phenotypes, the level of oxidized AAT (g/L) was significantly higher in smokers compared to non-smokers ($p = 0,014$). The frequency of the MSRA rs10903323 allele was as follows: A allele in the control group 89,5% and A allele in HOBP patients 90,0%; G

allele in the control group 10,5% and G allele in COPD patients 10,0%. The frequencies of the analyzed genetic variants of the MSRA rs10903323 polymorphism in the control group and in COPD patients were in H-W equilibrium ($p=0,880$ and $p=0,380$, respectively). By examining the association of the MSRA rs10903323 polymorphism and smoking, this study showed that in the group of smoker patients, the level of oxidized AAT (%) was significantly higher in heterozygotes AG compared to homozygotes AA ($p=0,028$).

SIA-elastase, oxidized AAT, AAT deficient phenotypes and age above 60 are detected as independent predictors for the occurrence of COPD. Also, smoking, as is known so far, was also confirmed in our study as an independent predictor of COPD. Significantly reduced values of SIA-elastase and SIA-trypsin in male patients who are smokers compared to non-smokers indicates the joint effect of gender and smoking on reduced functional activity of AAT and a greater tendency to the appearance and development of COPD. It was shown that the presence of the G allele, associated with smoking, is a risk factor for increasing the level of AAT oxidation. Also, this study showed that in the group of smoking patients with a severe form of the disease (GOLD3+4), carriers of the AG genotype have a higher level of oxidized AAT compared to AA homozygous carriers.

Prevention and early diagnosis of COPD are important for individuals with a family history of this disease. Phenotyping of AAT and genotyping of MSRA rs10903323 are potentially clinically significant for the early identification of individuals at increased risk of developing COPD, especially in the smoker group. Additionally, parameters such as the functional activity of AAT, SIA-elastase, and oxidized AAT are potential biomarkers for the onset of COPD, particularly in smokers.

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease, MSRA, polymorphism, oxidatively modified alpha-1-antitrypsin, specific inhibitor activity to elastase, specific inhibitor activity to trypsin, AAT phenotype.

Lista skraćenica korišćenih u tekstu

AAT	Alfa-1-antitripsin
AATD	Deficijencija alfa-1-antitripsina (eng. <i>Alpha-1-antitrypsin deficiency</i>)
ANOVA	Analiza varijanse
AOPPs	Uznapredovali produkti oksidacije proteina (eng. <i>Advanced oxidation protein products</i>)
BAPNA	N- α -benzoil-dl-arginin-p-nitroanilid
BMI	Indeks telesne mase (eng. <i>Body mass index</i>)
CCD	Eng. <i>Charged-Coupled Device</i>
CD4+	Klaster diferencijacije 4
CD8+	Klaster diferencijacije 8
CI	Interval pouzdanosti (eng. <i>Confidence Interval</i>)
CRP	C-reaktivni protein
CYP450	Citohrom P-450 zavisne monooksigenaze (<i>Cytochrome P-450</i>)
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	Dezoksiribonukleotidtrifosfat
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiaminotetrasirćetna kiselina
EIC	Elastaza inhibitorni kapacitet
ERAD	Degradacija povezana sa endoplazmatičnim retikulumom (eng. <i>ER-associated degradation</i>)
FEV1	Forsirani ekspiratorni volumen u 1sekundi
FEV1/FVC indeks	Tiffeneau-Pinelli indeks
FVC	Forsirani vitalni kapacitet
GOLD	Globalna inicijativa za hroničnu opstruktivnu bolest pluća
HDAC2	Histon deacetilaza
HOBP	Hronična opstruktivna bolest pluća
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
LRP	Receptor za proteine slične lipoproteinu niske gustine (eng. <i>Low-density lipoprotein receptor related protein</i>)
LSD	Najmanja značajna razlika (eng. <i>Least significant difference</i>)
MAPK	Mitogenom aktivirana protein kinaza
MDA	Malonildialdehid
MetRO	Metionin-R-sulfoksid
MetSO	Metionin-S-sulfoksid
MMP	Matriks metaloproteinaza
MSR	Metionin sulfoksid reduktaza
MSRA	Metioninsulfoksid reduktaza A

MSRB	Metionin sulfoksid reduktaza B
NADPH oksidaza	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
NF-kapaB	Nuklearni faktor κ B
Nrf2	Nuklearni eritroid-2-vezan faktor-2 (eng. <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
OR	(eng. <i>Odd Ratio</i>)
p	Statistička značajnost
PAS	(Eng. <i>Periodic acid–schiff-stain positive inclusions</i>)
PCR	Reakcija lančane polimerizacije (eng. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	Metoda polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata
PM	Atmosferske čestice (eng. <i>Particulate matter</i>)
r	Pearsonov koeficijent
RCL	Reaktivna centralna petlja (eng. <i>Reactive Center Loop</i>)
SERPINA	Eng. <i>Serine protease inhibitors</i>
-SH	Sulfhidrilna grupa
SIA	Specifična inhibitorna aktivnost
SIRT1	Sirtulin-1
SOD2	Superoksid dismutaza 2
STAPNA	N-sukcinil-L-alanil-L-alanil-L-alanil-p-nitroanilida
TAE	Tris-acetatni pufer
TBE	Tris-boratni pufer
TGF β	Tranformišući faktor rasta β (eng. <i>Transforming growth factor-β</i>)
TIC	Tripsin inhibitorni kapacitet
TNF- β	Faktor nekroze tumora β
TR	Tioredoxin reduktaza
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
TRX	Tioredoxin
β (S.E)	Koeficijent regresije β (standardna greška za β)
χ^2 -test	Chi-kvadrat test
8-oksodG	8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 HRONIČNA OPSTRUKTIVNA BOLEST PLUĆA	1
1.1.1 DIJAGNOSTIKA I KLASIFIKACIJA TEŽINE HOBP	1
1.1.2 SIMPTOMI I TOK HOBP	2
1.2 PATOGENEZA HOBP	2
1.2.1. HRONIČNA INFLAMACIJA U HOBP	2
1.2.2. OKSIDATIVNI STRES U HOBP	3
1.2.3. ULOGA STARENJA PLUĆA U HOBP	5
1.3. FAKTORI RIZIKA ZA POJAVU I RAZVOJ HOBP	6
1.3.1. EGZOGENI FAKTORI RIZIKA: ZAGAĐENJA IZ SPOLJNE SREDINE	6
1.3.1.1. Pušenje kao faktor rizika za razvoj HOBP	7
1.3.2 ENDOGENI FAKTORI RIZIKA: GENETIČKI FAKTORI	8
1.3.2.1. Genetički faktori rizika	8
1.4. ALFA-1-ANTITRIPSIN	8
1.4.1. ULOGA I ZNAČAJ ALFA-1-ANTITRIPSINA U ZAŠTITI PLUĆA	8
1.4.2. STRUKTURA ALFA-1-ANTITRIPSINA I ZNAČAJ AKTIVNOG CENTRA	9
1.4.3. POLIMORFIZAM ALFA-1-ANTITRIPSINA	10
1.4.4. OKSIDACIJA METIONINA U AKTIVNOM CENTRU ALFA-1-ANTITRIPSINA	12
1.5. SISTEM METIONIN SULFOKSID REDUKTAZA	12
1.5.1 STRUKTURA I IZOMERNI OBLICI METIONIN SULFOKSID REDUKTAZA	12
1.5.2 MEHANIZAM DELOVANJA METIONIN SULFOKSID REDUKTAZE	12
1.5.3 POTENCIJALNA POVEZANOST SISTEMA METIONIN SULFOKSID REDUKTAZE A SA HOBP	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1 ISPITANICI	17
3.2 MATERIJAL	17
3.3 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ALFA-1-ANTITRIPSINA I PARAMETARA FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI ALFA-1-ANTITRIPSINA	17
3.3.1 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ALFA-1-ANTITRIPSINA	17
3.3.2 ODREĐIVANJE ELASTAZA INHIBITORNOG KAPACITETA (EIC), SPECIFIČNE INHIBITORNE AKTIVNOSTI ALFA-1-ANTITRIPSINA PREMA ELASTAZI I ANTELASTAZNE AKTIVNOSTI	18
3.3.3 ODREĐIVANJE TRIPSIN INHIBITORNOG KAPACITETA (TIC), SPECIFIČNE INHIBITORNE AKTIVNOSTI ALFA-1-ANTITRIPSINA PREMA TRIPSINU (SIA-TRIPSIN) I ANTITRIPSINSKE AKTIVNOSTI	20
3.3.4 ODREĐIVANJE OKSIDOVANOG ALFA-1-ANTITRIPSINA	22
3.4 METODA ZA ODREĐIVANJE FENOTIPA ALFA-1-ANTITRIPSINA-IZOELEKTROFOKUSIRANJE	23
3.5 METODE ZA ODREĐIVANJE GENSKIH VARIJANTI ENZIMA METIONIN SULFOKSID REDUKTAZE A	25
3.5.1 IZOLACIJA DNK	25
3.5.2 REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA DNK POLIMERAZOM	26
3.5.3 ELEKTROFOREZA U GELU OD AGAROZE	27
3.5.4 DIGESTIJA PRODUKATA PCR REAKCIJE	28
3.5.5 ELEKTROFOREZA U GELU OD POLIAKRILAMIDA	29

3.6 STATISTIČKA ANALIZA	29
4. REZULTATI	30
4.1. ISPITIVANJE UTICAJA FAKTORA RIZIKA NA KVANTITATIVNE PARAMETRE AAT	30
4.1.1 KARAKTERISTIKE KONTROLNE GRUPE I GRUPE PACIJENATA SA HOBP: DESKRIPTIVNA ANALIZA; ANALIZA RAZLIKA KVANTITATIVNIH PARAMETRA AAT I SPIROMETRIJSKIH PARAMETARA	30
4.1.2 KORELACIJA IZMEĐU PARAMETARA FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI AAT I OKSIDOVANOG AAT	31
4.1.3 ANALIZA UTICAJA PUŠAČKOG STATUSA (PUŠAČI I NEPUŠAČI) NA FUNKCIONALNU AKTIVNOST AAT I OKSIDOVANI OBLIK AAT U KONTROLNOJ GRUPI I GRUPI PACIJENATA SA HOBP	32
4.1.4 ANALIZA UTICAJA PUŠENJA (PUŠAČI, BIVŠI PUŠAČI I NEPUŠAČI) NA PARAMETRE FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI AAT I OKSIDOVANI OBLIK AAT KOD ZDRAVIH ISPITANIKA I PACIJENATA SA HOBP	34
4.1.5 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLA I PUŠAČKOG STATUSA NA PARAMETRE FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI AAT, NIVO OKSIDOVANOG AAT I PARAMETRE FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI PLUĆA KOD HOBP-PACIJENATA	35
4.1.6 FUNKCIONALNA AKTIVNOST AAT, OKSIDOVANI AAT I PARAMETRI PLUĆNE FUNKCIJE KOD PACIJENATA SA HOBP PODELJENIH PREMA TEŽINI BOLESTI	38
4.1.7 ANALIZA UTICAJA PUŠENJA (PUŠAČ, NEPUŠAČ) NA NIVO OKSIDOVANOG AAT I SIA-ELASTAZE KOD KONTROLNE GRUPE I PACIJENATA PODELJENIH PREMA TEŽINI HOBP (GOLD2, GOLD3+4)	39
4.2 ANALIZA FENOTIPOVA ALFA-1-ANTITRIPSINA	40
4.2.1 ANALIZA RASPODELE ALELA I FENOTIPOVA ALFA-1-ANTITRIPSINA U KONTROLNOJ GRUPI I KOD HOBP-PACIJENATA	40
4.2.2 ANALIZA RAZLIKE U DISTRIBUCIJI NEDEFICIJENTNIH I DEFICIJENTNIH FENOTIPOVA AAT IZMEĐU KONTROLNE GRUPE I HOBP-PACIJENATA	41
4.2.3 ANALIZA RAZLIKE U DISTRIBUCIJI NORMALNIH (MM) I MUTIRANIH (MF, MS, MZ, SZ) FENOTIPOVA AAT IZMEĐU KONTROLNE GRUPE I HOBP-PACIJENATA	42
4.2.4 ISPITIVANJE POVEZANOSTI IZMEĐU FENOTIPOVA AAT (NEDEFICIJENTNI I DEFICIJENTNI), KONCENTRACIJE AAT, FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT U KONTROLNOJ GRUPI I KOD HOBP-PACIJENATA	43
4.2.5 ISPITIVANJE POVEZANOSTI IZMEĐU FENOTIPOVA AAT (MUTIRANI I NORMALNI), KONCENTRACIJE AAT, FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT KOD HOBP-PACIJENATA	44
4.2.6 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA AAT, PUŠAČKOG STATUSA I PRISUSTVA/ODSUSTVA HOBP NA FUNKCIONALNU AKTIVNOSTI AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT	45
4.2.7 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA AAT I GODINA STAROSTI NA SPIROMETRIJSKE PARAMETRE KOD PACIJENATA SA HOBP	48
4.2.8 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA M-SUBTIPOVA AAT (MM HOMOZIGOTI, MM HETEROZIGOTI), PRISUSTVA/ODSUSTVA HOBP I PUŠAČKOG STATUSA NA FUNKCIONALNU AKTIVNOST AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT	49
4.3 ANALIZA POLIMORFIZMA METIONIN SULFOKSID REDUKTAZE A (MSRA RS10903323) I NJEGOV ZNAČAJ U RAZVOJU HOBP	52
4.3.1 ANALIZA DISTRIBUCIJE ALELA I GENOTIPOVA MSRA RS10903323 U KONTROLNOJ GRUPI I KOD HOBP PACIJENATA	52
4.3.2 ISPITIVANJE POVEZANOSTI IZMEĐU POLIMORFIZMA MSRA RS10903323, FUNKCIONALNE AKTIVNOSTI AAT, NIVO OKSIDOVANOG AAT I TEŽINE BOLESTI	53
4.3.3 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323 I PRISUSTVA/ODSUSTVA HOBP NA NIVO AAT, FUNKCIONALNU AKTIVNOST AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT	54

4.3.4 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323, PRISUSTVA/ODSUSTVA HOBP I PUŠAČKOG STATUSA NA FUNKCIONALANU AKTIVNOST AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT	54
4.3.5 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323 I TEŽINE HOBP NA FUNKCIONALNU AKTIVNOST AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT KOD HOBP-PACIJENATA	58
4.3.6 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323, TEŽINE HOBP I PUŠAČKOG STATUSA NA FUNKCIONALANU AKTIVNOST AAT I NIVO OKSIDOVANOG AAT KOD HOBP-PACIJENATA	60
4.3.7 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323, GODINA STAROSTI I PUŠAČKOG STATUSA NA SPIROMETRIJSKE PARAMETRE KOD HOBP-PACIJENATA	61
4.3.8 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323, POLA I GODINA STAROSTI NA SPIROMETRIJSKE PARAMETRE KOD HOBP-PACIJENATA	62
4.3.9 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323 I PUŠAČKOG STATUSA NA SPIROMETRIJSKE PARAMETRE KOD HOBP-PACIJENATA	64
4.4 POVEZANOST IZMEĐU POLIMORFIZMA MSRA RS10903323, POLIMORFIZMA AAT I FUNKCIJE PLUĆA KOD PACIJENATA SA HOBP	65
4.4.1 ANALIZA UDRUŽENOG UTICAJA POLIMORFIZMA MSRA RS10903323 (AA/AG) I POLIMORFIZMA AAT (NEDEFICIJENTNI MM, MF/DEFICIJENTNI MS, MZ, SZ) NA PARAMETRE PLUĆNE FUNKCIJE KOD PACIJENATA SA HOBP	65
4.5 ANALIZA NEZAVISNIH PREDIKTORA ZA POJAVU HOBP	66
5. DISKUSIJA	68
5.1 UTICAJ PUŠENJA, POLA I STAROSTI NA NIVO AAT, OKSIDACIJU AAT I FUNKCIONALNU AKTIVNOST AAT I POVEZANOST SA POJAVOM I RAZVOJEM HOBP	68
5.2 ZNAČAJ POLIMORFIZMA AAT I INTERAKCIJE SA SREDINSKIM FAKTORIMA U NASTANKU I RAZVOJU HOBP	71
5.3 UTICAJ POLIMORFIZMA MSRA RS10903323 NA POJAVU HOBP	75
5.4 UDRUŽENI UTICAJ POLIMORFIZMA MSRA RS10903323 I VARIJANTI ALFA-1-ANTITRIPSINA NA NASTANAK HOBP	77
5.5 NEZAVISNI PREDIKTORI ZA POJAVU HOBP	77
6. ZAKLJUČCI	79
7. LITERATURA	80
8. BIOGRAFIJA	99
9. IZJAVE	99

1. Uvod

1.1 Hronična opstruktivna bolest pluća

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) je bolest koja se ispoljava postojanjem opstrukcije disajnih puteva, a nastaje zbog abnormalnosti u disajnim putevima i/ili alveolama, najčešće uzrokovanih izlaganju štetnim česticama i gasovima. Hronično ograničenje protoka vazduha, karakteristično za HOBP, posledica je bolesti malih disajnih puteva (bronhiolitis) i destrukcije parenhima (emfizem), pri čemu njihov doprinos u razvoju HOBP varira od osobe do osobe [1]. Emfizem dovodi do smanjenja alveolarne površine i otežane razmene gasova, što može uticati na razvoj hipoksije. Hronični bronhiolitis se definiše kao produktivan kašalj u trajanju od najmanje 3 meseca, u toku dve uzastopne godine, kod pacijenata kod kojih su drugi uzroci kašlja isključeni [2]. Emfizem predstavlja destrukciju alveolarne površine pluća gde se vrši razmena gasova [3]. Trajno suženje disajnih puteva i gubitak veza između alveola usled emfizema, rezultuje preranim zatvaranjem malih disajnih puteva pri izdisaju, dovodeći do zarobljavanja vazduha. Zadržani vazduh dovodi do pogoršanja simptoma pri naporu i do razvoja dispneje [4]. Opstrukcija je predominantno prisutna u malim disajnim putevima, manjim bronhima i bronhiolama, u perifernom delu pluća [1]. HOBP je obično progresivna i udružena sa inflamatornim odgovorom pluća na štetne čestice ili gasove. Egzacerbacija i komorbiditeti doprinose celokupnom napredovanju bolesti kod pojedinih pacijenata [5].

Prema rezultatima epidemioloških studija, procenjeno je da je 2010. godine oko 384 miliona ljudi bolovalo od hronične opstruktivne bolesti pluća, sa globalnom prevalencom od 11,7 %. Od posledica ove bolesti svake godine umre 3 miliona ljudi širom sveta, što je čini trećim vodećim uzročnikom smrtnosti na svetu [6]. Prema podacima iz 2020. godine, HOBP u Srbiji je na petom mestu kao uzrok smrtnosti od vodećih nezaraznih oboljenja, sa učešćem od 2,2 % [7]. Produženje životnog veka, odnosno starenje opšte populacije u svetu, tokom poslednjih 20 godina, utiče na značaj HOBP kao uzročnika smrtnosti [8].

1.1.1 Dijagnostika i klasifikacija težine HOBP

Sumnja na prisustvo HOBP trebalo bi da se ispita kod osoba starijih od 40 godina, koje ispoljavaju simptome poput kašlja, stvaranja sputuma, kratkog daha pri naporu i pojavu infekcija donjih respiratornih puteva, koje su česte ili traju duže od očekivanog (> 2 nedelje). Pretpostavka za prisustvo ove bolesti opravdana je kod individua koje imaju porodičnu istoriju, koji su pušači ili su izložene štetnim agensima iz okruženja [9].

Inicijalni test za dijagnozu HOBP je spirometrija. Ova metoda je neinvazivna, lako dostupna i pokazuje visoku reproducibilnost i osetljivost. Zasniva se na merenju forsirane izdahnute zapremine u 1 sekundi (eng. *Forced Expiratory Volume*, FEV1) i forsiranog vitalnog kapaciteta (eng. *Forced Vital Capacity*, FVC). FEV1 je količina vazduha koja se izdahne prilikom forsiranog izdaha u toku prve sekunde. FVC je forsirani vitalni kapacitet, odnosno ukupna količina vazduha koja se izdahne prilikom forsiranog izdaha. Vrednosti FEV1 i FVC se izražavaju u procentima. Spirometrija se izvodi nakon primene određene doze najmanje jednog bronhodilatatora, u cilju smanjenja varijabilnosti. Bolest se spirometrijski može potvrditi ukoliko je vrednost postbronhodilatarnog odnosa FEV1/FVC, poznatog kao Tiffeneau-Pinelli indeks, manja od 0,70. Prema GOLD (eng. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) [1] izvršena je klasifikacija težine opstrukcije disajnih puteva u HOBP na osnovu FEV1 vrednosti (GOLD):

GOLD I – blaga opstrukcija, sa vrednošću FEV1 ≥ 80 % od predviđenog,

GOLD II – umerena opstrukcija, sa vrednošću 50 % \leq FEV1 ≤ 80 % od predviđenog,

GOLD III – teška opstrukcija, sa vrednošću $30 \% \leq FEV1 \leq 50 \%$ od predviđenog,

GOLD IV – vrlo teška opstrukcija, sa vrednošću $FEV1 \leq 30 \%$ od predviđenog.

1.1.2 Simptomi i tok HOBP

HOBP se manifestuje kao hronični opstruktivni bronhiolitis i emfizem pluća, koji mogu biti praćeni hipersekrecijom mukusa. Opstrukcija je predominantno prisutna u malim disajnim putevima, manjim bronhima i bronhiolama dijametra do 2 mm, u perifernom delu pluća. Praćena je opadanjem FEV1 i FEV1/FVC vrednosti, koje se vremenom pogoršavaju. Trajno suženje disajnih puteva i gubitak veza između alveola, usled emfizema, rezultuje preranim zatvaranjem malih puteva pri izdisaju, dovodeći do zarobljavanja vazduha. Zadržani vazduh dovodi do pogoršanja simptoma pri naporu i do razvoja dispneje [4]. Dispneja se manifestuje otežanim disanjem, osećajem težine u grudima i nedostatkom vazduha [10]. Povećano stvaranje mukusa, usled povećanja broja goblet ćelija i uvećanja submukoznih žlezda, rezultuje pojavom produktivnog kašlja. Kašalj je obično prvi simptom HOBP, ali često zanemaren, kao očekivana posledica pušenja ili izlaganja zagađenjima [11].

Pojava egzacerbacije kod pacijenata sa HOBP započinje najčešće zbog respiratorne virusne infekcije, posebno infekcije rinovirusima, koje su uzrok prehlada, posebno tokom zime [12]. Zagađenja kojima je izložen respiratorni sistem mogu izazvati egzacerbaciju, posebno u interakciji sa respiratornim virusima. Prisustvo bakterija u vazдушnim putevima može da bude uzrok egzacerbacije, najčešće kao sekundarni izazivač, u toku već prisutne virusne infekcije. Egzacerbacija HOBP predstavlja pojavu pogoršanja simptoma, koji su najčešće povezani sa pojačanom inflamacijom u disajnim putevima [13]. Glavni simptomi egzacerbacije su pojačana dispneja, gnojni sputum i kašalj, kao i pojačano šištanje i uobičajeni simptomi prehlade [14]. Česte egzacerbacije snižavaju kvalitet života, zahtevaju povremenu hospitalizaciju pacijenta, dovode do brže progresije bolesti.

Komorbiditeti, kao što su koronarna arterijska bolest, aritmija, uključujući tahikardiju, hipertenzija i kongestivna bolest srca mogu da utiču na povećan rizik od smrtnosti kod pacijenata od HOBP. Pacijenti sa HOBP su u povećanom riziku od pojave kancera pluća, depresije i anksioznosti, metaboličkog sindroma i osteoporoze [15].

1.2 Patogeneza HOBP

Glavne fiziološke promene prisutne u donjim disajnim putevima tokom HOBP nastaju usled inflamacije i oksidativnog stresa, izazvanim udruženim delovanjem faktora domaćina i faktora sredine.

1.2.1. Hronična inflamacija u HOBP

Glavnu ulogu u patofiziologiji HOBP ima hronična inflamacija u disajnim putevima, koja doprinosi povećanoj mukosekreciji, stenozu manjih disajnih puteva i nastanku emfizema [16]. Hronična inflamacija ima za posledicu fibrozu vazдушnih puteva i moguće povećanje količine glatkih mišića, bilo direktno kao rezultat inflamacije ili indirektno zbog hronično povećanog mišićnog tonusa. Ovakva promena, povećavajući debljinu zida vazдушnih puteva, dovodi do suženja lumena i povećanja otpora pri kretanju vazduha. Istovremeno, inflamacija igra bitnu ulogu u destrukciji alveolarnih zidova. Ovo dovodi do povećanja otpora pri kretanju vazduha, usled deformacije i smanjivanja dijametra vazдушnih puteva [17]. Iako su inflamatorne promene dominantne u perifernim disajnim putevima i plućnom parenhimu, inflamacija je prisutna i u većim disajnim putevima.

Hronična inhalacija štetnih agenasa dovodi do odgovora urođenog imunog sistema aktiviranjem Toll-like receptora, što rezultuje oslobađanjem povećanog broja neutrofila i makrofaga. Makrofagi oslobađaju neutrofilne hemotaksične faktore, poput leukotriena B4 i interleukina-8. Aktivirani

makrofagi, zajedno sa neutrofilima, oslobađaju proteinaze i dovode do hipersekrecije mukusa. Epitelne ćelije oslobađaju pro-inflamatorni citokin faktor nekroze tumora β (eng. *Tumor necrosis factor beta*, TNF- β), koji ima ulogu u peribronhijalnoj fibrozi malih disajnih puteva, direktno ili putem oslobađanja faktora rasta vezivnog tkiva [18]. Elastin je bitna komponenta ekstracelularnog matriksa pluća, koja obezbeđuje integritet plućnog parenhima i malih vazdušnih puteva. Disbalans između elastaze i antielastaze u korist elastaze, povećava osetljivost pluća na destrukciju, koja dovodi do razgradnje elastina i uvećavanja vazdušnog prostora. Katepsini i proteaze poreklom iz neutrofila, makrofaga i epitelnih ćelija razlažu elastin i razaraju vezivno tkivo plućnog parenhima. Citotoksične T ćelije oslobađaju faktor nekroze tumora α (eng. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) i perforine koji uništavaju epitelne ćelije zida alveola [19].

Neutrofili su povišeni u sputumu pacijenata sa HOBP i koreliraju sa težinom bolesti [20]. Inverzni odnos između cirkulišućih neutrofila i vrednosti FEV1 je prisutan kod HOBP [21]. Matriks metaloproteinaze (MMP9 i MMP12) poreklom iz inflamatornih ćelija, posebno makrofaga, pokazuju elastoliznu aktivnost u plućnom parenhimu pacijenata sa emfizemom. Mnogi inflamatorni medijatori, prisutni u plućima pacijenata sa HOBP, su regulisani aktivacijom proinflamatornih transkripcionih faktora, poput NF-kapaB i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPKs), posebno p38 MAPK [22].

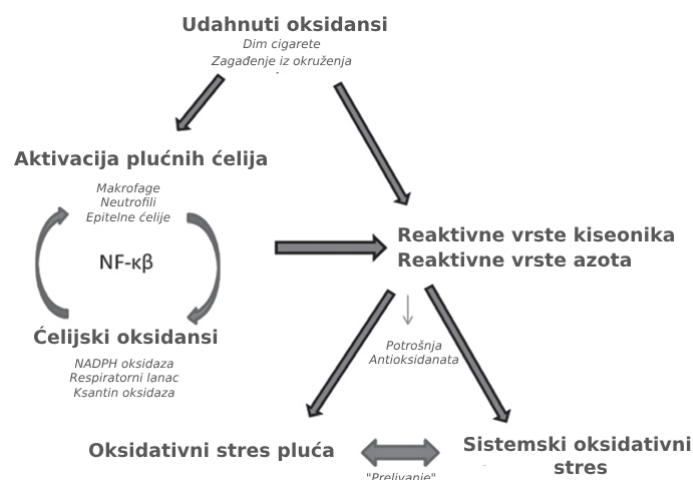
Aktivacija stečenog imunog odgovora se dešava kasnije i za posledicu ima oslobađanje T limfocita i B limfocita. U HOBP je uočen povećan broj CD8⁺ citotoksičnih T ćelija i CD4⁺ T helper ćelija. Limfociti formiraju limfoidne čvorove, u kojima T ćelije okružuju B ćelije, a koji mogu da aktiviraju i povećaju broj dendritičnih ćelija [23]. Dendritične ćelije formiraju mrežu u gornjem sloju plućnog epitela i prepoznaju štetni antigen. Mogu da aktiviraju ćelije imunog sistema, preventivno Th1 i Th2 limfocite [24]. Ove ćelije povezuju aktivnosti stečenog i urođenog imuniteta [25]. Kod pacijenata sa težim oblicima bolesti, iz limfoidnih folikula koje sačinjava povećan broj B ćelija okruženih T ćelijama, može se proizvoditi IgE, obično usled kolonizacije bakterijama ili latentne virusne infekcije u disajnim putevima [23]. Ćelije CD8⁺ T su brojnije u odnosu na CD4⁺ T u disajnim putevima i plućnom parenhimu pacijenata sa HOBP [26]. Tip 1 citotoksičnih CD8⁺ T ćelija (Tc1) oslobađa granzim B i perforine, koji su prisutni u većoj količini u sputumu pacijenata sa HOBP nego zdravih ljudi koji su isto pušači, a mogu da indukuju apoptozu pneumocita tipa 1 i doprinesu razvoju emfizema [27] i rad [28]. Broj CD4⁺ helper 17, koji proizvode IL-17, takođe su povećane u plućima i doprinose razvoju inflamacije [29].

Perzistentna sistemska inflamacija dovodi do ubrzanog propadanja plućne funkcije, egzacerbacije bolesti i mortaliteta [18].

1.2.2. Oksidativni stres u HOBP

Razvoju i progresiji inflamacije u HOBP doprinosi narušavanje ravnoteže između antioksidantne zaštite pluća i oksidativnog stresa.

Oksidativni stres kod pacijenata sa HOBP posledica je povećane količine oksidanata, poreklom iz spoljašnje sredine unetih u organizam inhalatornim putem (Slika 1.), kao što su zagađen vazduh i dim cigareta, kao i slobodnih kiseoničnih i azotnih radikala oslobođenih iz leukocita i makrofaga, usled inflamatornih procesa u plućima. Slobodni radikali su vrlo nestabilna jedinjenja sa nesparenim elektronima, koji lako započinju oksidaciju i oštećuju DNK, lipide, ugljene hidrate i proteine, što doprinosi progresiji inflamacije [30].



Slika 1. Šematski prikaz uticaja udahnutih oksidanasa na organizam (preuzeto i adaptirano iz van Eden & Sin 2013) [30].

Pluća su zaštićena od štetnog okruženja tečnim zaštitnim slojem koji prekriva mukozu alveola, malih i velikih disajnih puteva, a sadrži nekoliko antioksidanata, poput askorbinske kiseline (vitamin C), alfa tokoferola (vitamin E) i mokraćne kiseline. Veći molekuli, poput albumina i mucina, mogu takođe imati antioksidantni potencijal preko sulfhidrilnih grupa. Istraživanja pokazuju vezu između sniženog nivoa antioksidanata, alfa-tokoferola i askorbinske kiseline, i propadanja plućne funkcije kod HOBP [31].

Reaktivni slobodni radikali nastaju brojnim mehanizmima. Superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) nastaje iz NADPH (redukovani nikotinamid-dinukleotid fosfat) i kiseonika dejstvom NADPH-oksidade, što je prikazano u reakciji (1). Potom se $O_2^{\cdot-}$ konvertuje u H_2O_2 delovanjem superoksid-dismutaze, kao u reakciji (2). Nastali vodonik-peroksid se razlaže na vodu i kiseonik (O_2) u prisustvu katalaze, što je prikazano u jednačini (3). U prisustvu slobodnog gvožđa superoksidni anjon $O_2^{\cdot-}$ i vodonik-peroksid formiraju visokoreaktivni hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), prikazano u reakciji (4). Reakcija (5) prikazuje kako superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$) u reakciji sa azot monoksidom (NO), dovodi do stvaranja reaktivnih peroksinitrita (ONOO-).

- (1) $2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$
- (2) $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- (3) $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$
- (4) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} + HO^{\cdot}$
- (5) $NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^-$

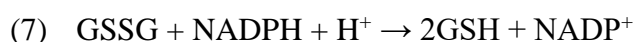
Oksidativni stres dovodi do neenzimske oksidacije arahidonske kiseline i formiranja serije prostanoidnih medijatora, zvanih izoprostani, koji ispoljavaju značajne funkcionalne promene, uključujući bronhokonstrikciju i pojavu eksudata [18, 32].

Slobodni radikali izazivaju lipidnu peroksidaciju, pri čemu se oslobađa karbonilni produkt malondialdehid (MDA), koji ima sposobnost da stimuliše plućnu inflamaciju [30]. Pacijenti sa HOBP imaju povišen nivo MDA u perifernoj cirkulaciji, koji je u korelaciji sa progresijom bolesti [33]. Najrasprostranjeniji oblik oksidativnog oštećenja proteina je proteinska karbonilacija. Karbonilacija proteina dovodi do modifikacije funkcije proteina, ometanja normalne ćelijske funkcije i fizioloških procesa. Kada su izložene karbonilnom stresu, epitelne ćelije respiratornog trakta indukuju stvaranje slobodnih radikala [31]. Karbonilni derivati, aldehidi i ketoni, nastaju reakcijom oksidanasa sa lizinom, argininom, prolinom i treoninom iz proteinskih bočnih lanaca. Direktnom reakcijom proteina i kiseoničnih radikala mogu se formirati peptidni fragmenti, koji sadrže visoko reaktivne karbonilne grupe. Proteini, koji sadrže reaktivne karbonilne grupe, takođe se mogu formirati sekundarnom

reakcijom proteinskih rezidua lizina sa redukujućim šećerima ili njihovim oksidativnim produktima. Pored toga, karbonilni derivati u proteinskoj strukturi mogu biti proizvod reakcije lizina, cisteina ili histidina sa nezasićenim aldehidima, koji su nastali peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina. Za procenu nivoa oksidantima posredovanog oštećenja proteina kod pacijenata sa HOBP, može se ispitivati prisustvo uznapredovalih produkata oksidacije proteina (eng. *advanced oxidation protein products*, AOPP) [33, 34]. Tioli, klasa jedinjenja koja sadrže sulfhidrilnu grupu (-SH), uglavnom su u plazmi prisutni u okviru proteina ili tiolnih jedinjenja male molekulske mase poput cisteina, glutationa (GSH), γ -glutamil-cisteina, metionina, i predstavljaju ključne faktore u redoks osetljivim reakcijama. Tioli podležu oksidativnim procesima u prisustvu oksidanasa, pri čemu nastaju brojni produkti, kao što su disulfidi. Oni se mogu redukovati nazad u tiole, u prisustvu odgovarajućih reduktaza [33].

Posledica prisustva slobodnih radikala je aktivacija različitih signalnih puteva u ćeliji, kao što su MAP kinaze, koje povećavaju ekspresiju gena faktora odgovornih za proinflamatorne, proapoptične i antiproliferativne odgovore [35]. Nuklearni faktor Nrf2 (eng. *nuclear factor-erythroid2-related factor2*), transkripcioni faktor prvenstveno zastupljen u plućnom epitelu i alveolarnim makrofagima, ima ulogu u aktivaciji gena koji učestvuju u zaštiti od oksidativnog stresa. Pacijenti sa HOBP mogu imati smanjenu ekspresiju hemoksigenaze 1 i katalaze, komponenti antioksidantnog odgovora Nrf2, kao i smanjenu količinu citohrom c oksidaze, koja je mitohondrijalni antioksidativni enzim [36, 37].

Glutation peroksidaza redukuje H_2O_2 u H_2O , pri čemu se glutacion oksiduje kao u reakciji (6). Redukcija oksidovanog oblika GSSG je katalizovana glutacion-reduktazom kroz glutationski ciklus, kao što je prikazano u reakciji (7). Upravo sposobnost obnavljanja redukovanog oblika GSH, čini glutationski ciklus ključnim u antioksidantnoj odbrani ćelije i sprečava trošenje ćelijskih tiola [35].



Nivo glutaciona je snižen oko bronhijalnog epitela u alveolarnim makrofagima, kod pušača i pacijenata sa HOBP [38] dok je oksidovani oblik ovog enzima GSSG povišen u sputumu pacijenata [39]. Transformišući faktor rasta β (eng. *transforming growth factor- β* , TGF β) je povišen kod pacijenata sa HOBP i inhibira ekspresiju antioksidantnih enzima, katalaze i superoksid dismutaze 2 (SOD2) u glatkim mišićnim ćelijama disajnih puteva [40]. Ceruloplazmin je značajan antioksidant iz plazme i značajno je povišen kod HOBP [41, 42].

Oksidativni stres dovodi do oštećenja DNK, pri čemu mehanizmi popravke oštećenja DNK na dvostrukoj spirali u HOBP mogu biti nefunkcionalni, što doprinosi razvoju kancera pluća [43]. Značajan marker za procenu oksidativnog oštećenja DNK je 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oksodG).

1.2.3. Uloga starenja pluća u HOBP

Kako je hronična opstruktivna bolest pluća prvenstveno prisutna u starijoj populaciji, postoje podaci koji ukazuju da je emfizem uzrokovan upravo ubrzanim starenjem plućnog parenhima, koji ima oslabljene mehanizme oporavka organizma, poput onih koji uključuju aktivnost sirtuina (SIRT) [44]. Incidenca hroničnih bolesti, poput HOBP, raste sa godinama kada je i značajano prisutna akumulacija ćelijskih oštećenja [45]. Starenje pluća se karakteriše fiziološkim i strukturalnim promenama. Karakteristike starenja pluća prisutne u HOBP su opadanje plućne funkcije, smanjenje mukocilijarnog klirensa, opadanje nivoa antioksidanata, starački emfizem i promenjeni proteini ekstracelularnog matriksa. Mutacije u genima odgovorne za skraćenje telomera, glavnog znaka starenja, povezane su sa teškim oblicima emfizema [46]. Starenje ćelija i smanjena aktivnost SIRT1 utvrđena je u cirkulišućim endotelnim progenitorskim ćelijama kod pacijenata sa HOBP [47].

Tokom starenja takođe slabi autofagija, sposobnost ćelija da uklanjaju oštećene ćelijske komponente i razgrađene unutarćelijske makromolekule [45]. Potvrđena je defektna autofagija u alveolarnim makrofagima i kod pušača [48]. Dosadašnja ispitivanja ukazuju na postojanje defektivne autofagije i akumulacije autofagozoma kod pacijenata sa HOBP, koje vode bržem starenju i smrti ćelija [49]. Prema pojedinim studijama učestalost HOBP je 2-3 puta veća kod osoba starijih od 60 godina u odnosu na mlađe [50, 51, 52].

1.3. Faktori rizika za pojavu i razvoj HOBP

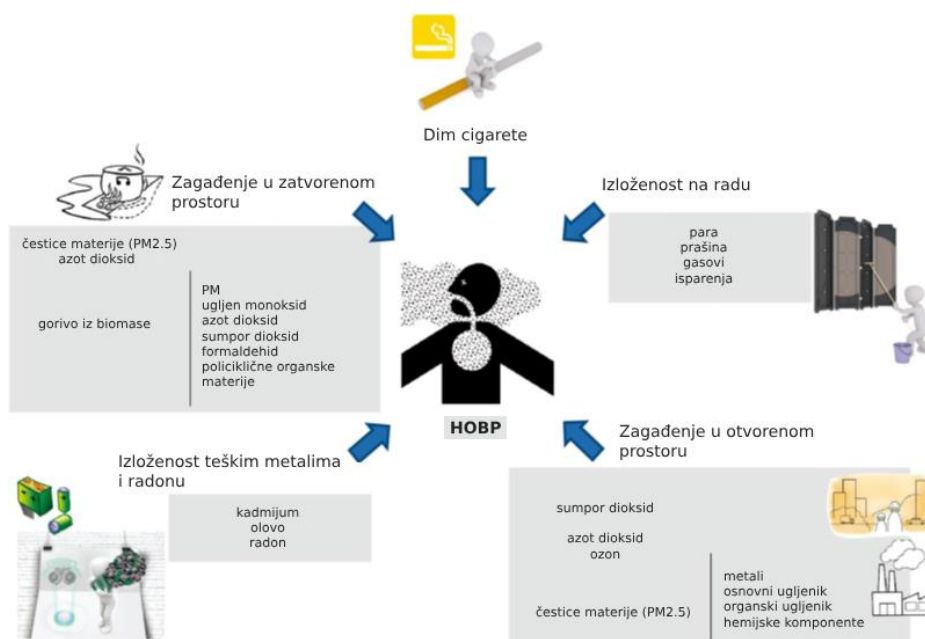
Razvoj HOBP je posledica udruženog dejstva više faktora, koji se mogu podeliti na egzogene i endogene. Egzogeni faktori rizika su duvanski dim, zagađenje vazduha u zatvorenom prostoru, profesionalna izloženost štetnim agensima, zagađenje vazduha na otvorenom, socioekonomski status. Endogeni faktori su, prema GOLD [1] genetički faktori, godine i pol, poremećaj u rastu i razviću pluća, infekcije, astma i hronični bronhitis.

1.3.1. Egzogeni faktori rizika: zagađenja iz spoljne sredine

Zagađenja poreklom iz spoljne sredine imaju uticaj na razvoj plućnih bolesti, kao i egzacerbaciju i smrtnost kod HOBP (Slika 2.). Ključni zagađivači su sumpor-dioksid, azot-dioksid, ozon i PM atmosferske čestice (eng. *particulate matter*, PM). Glavni izvori zagađenja vazduha su izduvni gasovi motornih vozila, industrije i elektrana. Najviše proučavana atmosferska čestica, prečnika manjeg od 2,5 μm je PM 2.5 koju čine suspendovani metali, hemijska jedinjenja i organski ugljenik [53]. Izlaganje teškim metalima, poput olova i kadmijuma, predstavlja faktore rizika za pojavu HOBP, dok izlaganje radonu povećava mortalitet kod pacijenata sa HOBP [54, 55].

Profesionalna izlaganja parama, prašini, gasovima i isparenjima su dodatni faktori rizika za pojavu HOBP, sa uticajem na prognozu HOBP [56].

Zagađenje vazduha u zatvorenom prostoru potiče od sagorevanja biomase za potrebe kuvanja ili grejanja. Ovo je od posebnog značaja u zemljama u razvoju kod osoba ženskog pola, koje su često i dugo izložene ovim agensima. Dim koji se emituje pri sagorevanju biomase sadrži PM, ugljen-monoksid, sumpor-dioksid, formaldehid i policiklična organska jedinjenja [53, 57].



Slika 2. Faktori rizika za hroničnu opstruktivnu bolest pluća poreklom iz životne sredine (preuzeto i adaptirano iz Kim & Lee 2017) [53].

1.3.1.1. Pušenje kao faktor rizika za razvoj HOBP

Upotreba duvana je uzrok smrti preko 8 miliona ljudi godišnje. Više od 7 miliona ovih smrtnih ishoda direktna je posledica dejstva pušenja, dok kod oko 1,3 miliona uzrok smrti je pasivno izlaganje duvanskom dimu. Pasivno pušenje uzrokuje ozbiljna kardiovaskularna i respiratorna oboljenja, uključujući koronarnu bolest srca i rak pluća [58].

Dim cigarete sadrži više od 7300 hemijskih sastojaka distribuiranih u gasnoj komponenti i katranu, među kojima su mnoge potentni karcinogeni. U štetne komponente se ubrajaju ugljovodonična jedinjenja, prvenstveno izopren, benzen i benzo[a]piren. Značajne toksične komponente poreklom iz cigarete su nikotin, ugljen monoksid, oksidi azota, cijanovodonik, nitrozamini i teški metali sa prooksidantnim potencijalom poput arsena, kadmijuma, hroma, gvožđa, žive, olova, nikla, vanadijuma. Visoko reaktivni slobodni radikali nalaze se u gasnoj fazi u količini 10^{15} po udahu i u katranskoj fazi 10^{17} /gram. Kratkoživeći slobodni radikali iz gasne faze stvaraju se u reakciji azotovih oksida sa različitim ugljovodonicima i kiseonikom, pri čemu nastaju kiseonični radikali, peroksinitratni i peroksinitritni estri. Glavni slobodni radikali u katranskoj fazi su dugoživeći semikvinoni, koji u reakciji sa kiseonikom daju visokotoksične reaktivne kiseonične vrste [59].

Iako se pušenje smatra glavnim predisponirajućim faktorom za razvoj HOBP, procena je da ne više od 30-50% pušača oboli od ove bolesti, što ukazuje da značajan doprinos imaju drugi faktori okruženja i genetički faktori [60].

Postoji više mehanizama koji su uključeni u proces zaštite pluća od dejstva štetnih agenasa iz spoljašnje sredine. Niži disajni putevi su zaštićeni od inhalacije štetnih gasova i čestica pomoću mukocilijarnog transporta i refleksa kašlja, koji čiste površinu disajnih puteva. Čvrste međucelijske veze (eng. *tight junction*), prisutne između proteina dveju membrana epitelnih ćelija, obezbeđuju selektivnu propustljivost i predstavljaju fizičku barijeru [61]. Usled izlaganja respiratornog sistema zagađenom okruženju, mukocilijarni klirens opada, produkcija mukusa raste i epitelna barijera postaje oštećena. Epitelne ćelije i monociti/makrofagi odgovaraju na ovakve agense oslobađanjem mnogobrojnih citokina i hemokina, koji kontrolišu migriranje ćelija urođenog imuniteta u oštećeno tkivo [62]. Duvanski dim dovodi do slabljenja antioksidativne zaštite ireverzibilnom modifikacijom glutationa (GSH) i drugih redoks-osetljivih signalnih proteina i transkripcionih faktora poput Nrf2 (eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), koji je dominantno prisutan u epitelu i alveolarnim makrofagima [30].

Pušači sa normalnom funkcijom pluća imaju povećan nivo inflamacije u disajnim putevima, dok je ona značajno izraženija kod pacijenata sa HOBP, posebno u fazi akutne egzacerbacije. Pojačan inflamatorni odgovor se može objasniti redukovanom ekspresijom histon deacetilaze 2 (HDAC2) u ćelijama makrofaga i endotelnim ćelijama pluća, što rezultuje aktivacijom mnogih inflamatornih gena [63]. Pasivno izlaganje duvanskom dimu takođe, doprinosi razvoju HOBP, usled opterećenja pluća štetnim česticama i gasovima [64]. Pasivno pušenje ima nepovoljan uticaj na ishod HOBP, posebno kod gojaznih osoba. Boravak u prostoru sa pušačima pogoršava respiratorne simptome i povećava rizik od teške egzacerbacije [65]. Štetni efekti pušenja su dozno i vremenski zavisni, što se manifestuje kroz različit stepen oštećenja pluća pri akutnom, subakutnom i hroničnom izlaganju [66]. Prekid pušenja može da smanji napredovanje inflamacije i razvoj HOBP, dok i povremeni prekid u konzumiranju cigareta doprinose smanjenju simptoma poremećaja plućne funkcije [67]. Alveolarno-kapilarna barijera, koju čine zid alveolarnog epitela i endotelnih ćelija, a služi za razmenu O_2 i CO_2 , ne predstavlja samo pasivnu barijeru, već može posredovati u razvoju akutne i hronične inflamacije [66]. Gubitak ćelijskih veza i oštećenja plućnog endotela su mikroskopski potvrđeni kod pušača obolelih od HOBP [68]. Biopsija bronhija iz centralnih disajnih puteva pokazuje da pušači imaju hronične inflamatorne promene, sa povećanim brojem inflamatornih ćelija u različitim delovima pluća, kao i strukturne promene [60].

1.3.2 Endogeni faktori rizika: genetički faktori

U endogene faktore rizika za nastanak HOBP spadaju genetički faktori, pol i starost. Njihov uticaj zavisi od interakcije sa sredinskim faktorima.

1.3.2.1. Genetički faktori rizika

Najznačajniji i u brojnim studijama dokazani genetički faktor rizika za pojavu HOBP je urođena deficijencija alfa-1-antitripsina (eng. *Alpha-1 antitrypsin deficiency*, AATD). Zaštita plućnog parenhima od razornog delovanja elastaze iz neutrofila (NE) posebno je oslabljena usled niskih koncentracija AAT u cirkulaciji, koje su karakteristične za ovo nasledno oboljenje. Povezanost između urođenog deficita AAT i rane pojave emfizema, kod osoba mlađih oneutrofilad 50 godina, prvi put su opisali Laurell i Eriksson, 1963. godine [69]. Oko 1% pacijenata sa HOBP su nosioci deficijentnih varijanti AAT [70]. Takođe, sistemska analiza studija koje su obuhvatale evropsku populaciju pokazuje da homozigotni nosioci deficijentnih alela za AAT čine svega 0,12% obolelih od HOBP [71]. Smatra se da koncentracija AAT od 0,6 g/L (11mM) ili niža predstavlja rizik za oštećenje pluća, usled neadekvatne antielastazne zaštite [72]. Od značaja za pojavu HOBP je alfa-1-antitripsin, takođe inhibitor serin proteaza i reaktant akutne faze [73]. Studije pokazuju da je njegova deficijencija povezana sa pojavom astme u dečijem uzrastu, kao i pojavu HOBP [74, 75, 76]. Vitamin D-vezujući protein, koji pored vitamina D ima sposobnost da vezuje ekstracelularni aktin i endotoksin, takođe pokazuje uticaj na intenzitet inflamatornih reakcija [77, 78]. Kako je vitamin D-vezujući protein kodiran polimorfnim genom, pojedina istraživanja su pokazala značajnu razliku u frekvenci određenih genotipova kod HOBP pacijenata i zdravih [79]. Takođe, genetički faktor rizik za pojavu kancera pluća i HOBP predstavlja mutacija u genu CYP1A1, koji kodira enzim citohrom P450A1. Mutacija se odigrava na egzonu 7, što za posledicu ima zamenu aminokiseline izoleucin valinom na poziciji 462 u proteinu. Ovom promenom aktivnost enzima se duplo uvećava, što se dovodi u vezu sa sklonošću za razvoj emfizema i kancera pluća [80, 81]. P450A1 ima ulogu u prvoj fazi metabolizma i može dovesti do aktivacije prokancerogena i ksenobiotika.

Uloga urođene deficijencije imunoglobulina A (IgA) i imunoglobulina G (IgG) u etioloiji HOBP, pokazana je u nekoliko studija. Nedostatak ova dva imunoglobulina doveden je u vezu sa poremećenom funkcijom pluća [82]. U jednom od istraživanja pokazana je pozitivna korelacija između IgG2 i FEV1 [83].

1.4. Alfa-1-antitripsin

1.4.1. Uloga i značaj alfa-1-antitripsina u zaštiti pluća

Alfa-1-antitripsin (AAT) je glavni inhibitor serin proteaza u cirkulaciji i pripada velikoj familiji inhibitora serin proteaza, pod nazivom serpini (eng. *Serine Protease Inhibitors*, *Serpins*) [84]. AAT je glikoprotein, molekulske mase 52 kDa i kodiran je *SERPINA1* genom (serin proteaza inhibitor, grupa A, član 1) [85]. Superfamiliji *SERPINA* pripadaju strukturno slični proteini, koji kontrolišu procese koagulacije krvi, fibrinolize, inflamacije i programirane ćelijske smrti [86].

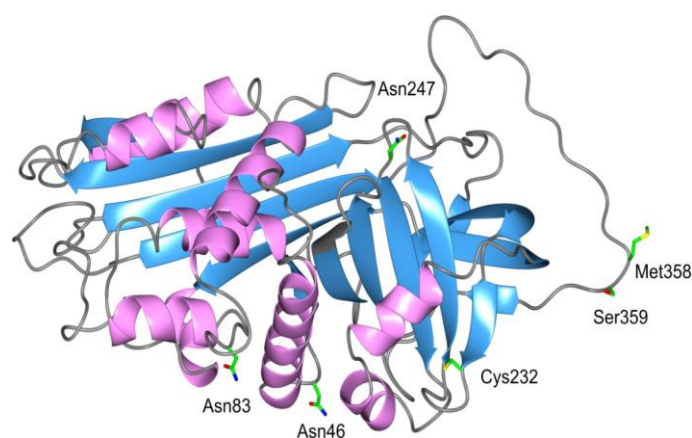
Primarna funkcija AAT je da inhibira neutrofilnu elastazu u donjem respiratornom traktu i štiti plućni parenhim od destrukcije, dok u manjoj meri inhibira i druge proteaze, poput katepsina G i proteinaze 3, koje su smeštene u primarnim azurofilnim granulama polimorfonuklearnih neutrofila [84]. Proteaze predstavljaju prvu liniju odbrane od infekcija i imaju ulogu u zaštiti pluća putem imunog odgovora učestvujući u intracelularnoj razgradnji fagocitovanih mikroorganizama. Međutim, usled akumulacije i aktivacije neutrofila dolazi do povećanog oslobađanja serin proteaza, što dovodi do oštećenja plućnog tkiva [87].

Primarno mesto sinteze AAT su hepatociti, a u manjim količinama sinteza se odvija u monocitima, makrofagima, alveolarnim ćelijama i intestinalnom epitelu [88]. Naziv AAT potiče od njegove sposobnosti da inhibira pankreasni tripsin *in vitro*. AAT je najrasprostranjeniji inhibitor serin proteaza u cirkulaciji čija je koncentracija kod zdravih osoba između 1,2 i 2,0 g/L, a poluživot u cirkulaciji mu je 5 dana [89]. S obzirom da je AAT rani reaktant akutne faze, njegov nivo u serumu se povećava 2-5 puta tokom inflamacije, infekcije, kancera i drugih stanja kao npr. u trudnoći [72]. Pokazano je da AAT ima antiinflamatorne osobine, nezavisno od njegove antiproteazne aktivnosti i da utiče na brojne ćelije, uključujući β -ćelije pankreasa [90], B limfocite [91], mast ćelije [92] i makrofage [93]. AAT je uključen u ćelijske procese poput endotelne ćelijske apoptoze, neutrofilne hemotakse i fibroblastima posredovane ekspresije citokina [94, 92]. Ekspresija AAT u jetri je pod kontrolom citokina, poput interleukina 1, TNF β i interleukina 6 [95].

1.4.2. Struktura alfa-1-antitripsina i značaj aktivnog centra

SERPINA1 gen, koji kodira AAT, smešten je na dužem kraku humanog hromozoma 14 (14p32.1). Sastoji se iz šest introna i sedam egzona. Egzoni su numerisani kao IA, IB, IC, II, III, IV i V. Promotorni regioni za makrofage i monocite nalaze se u egzonima IA i IB, dok je IC promotor aktivan u hepatocitima. U procesu transkripcije *SERPINA1* gena nastaje pre-informaciona RNK, koja prolazi proces dalje obrade, translata se u protein koji se sastoji od 394 amino kiselina [96].

AAT je po strukturi glikoprotein koji sadrži jedan slobodni cisteinski ostatak na poziciji 232, kao i tri slobodna asparaginom-vezana ugljenohidratna lanca na pozicijama 46, 83 i 247 (Slika 3.). Protein sačinjavaju devet α -heliksa koji se označavaju od A do I, tri β -ploče označenih od A do C i aktivni centar (eng. *Reactive Center Loop*, RCL) na poziciji Met358-Ser359, odgovoran za antiproteaznu aktivnost. Primenom kristalografije pokazano je da je AAT visoko organizovani globularni protein (Slika 3).



Slika 3. Šematski prikaz 3D strukture AAT. Struktura 9 α -heliksa je prikazana ljubičastom bojom i 3 β -ploče, plavom bojom. (Preuzeto i adaptirano iz Janciauskiene et al. 2018) [97].

Hemijska veza koja se ostvaruje u reakciji između proteaza i antiproteaza je nekovalentna [98]. AAT vezuje neutrofilnu elastazu u odnosu 1:1 sa konstantom asocijacije $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [99]. Reakcija formiranja kompleksa AAT-proteaza je praćena raskidanjem veza u aktivnom centru AAT i ireverzibilnom konformacionom promenom u inaktivan kompleks. Veza se formira između karboksilne grupe aktivnog mesta inhibitora serin proteaze, tj. AAT, i hidroksilne grupe iz aminokiseline serin iz proteaze. Nastali neaktivni kompleks između inhibitora serin proteaze i proteaze je visoko stabilan [86]. Kompleks koji se formira između AAT i elastaze ili neke druge serin proteaze se brže kataboliše nego nativni AAT, a katabolizam se odvija prvenstveno u ćelijama jetre. Na površini ćelija jetre i makrofaga smešten je receptor za serpin-enzim kompleks koji posreduje u endocitozi. Kompleks AAT sa elastazom može biti preuzet preko multifunkcionalnog

LRP receptora (eng. *low-density lipoprotein receptor related protein, LRP*) koji je uključen u preuzimanje i razgradnju plazma lipoproteina, proteaza i inhibitora proteaza [100]. Vezivanjem za ovaj receptor, aktivira se put signalne transdukcije za povećanu sintezu AAT čime se obezbeđuje regulacija sinteze AAT zavisna od njegove funkcionalne aktivnosti [101].

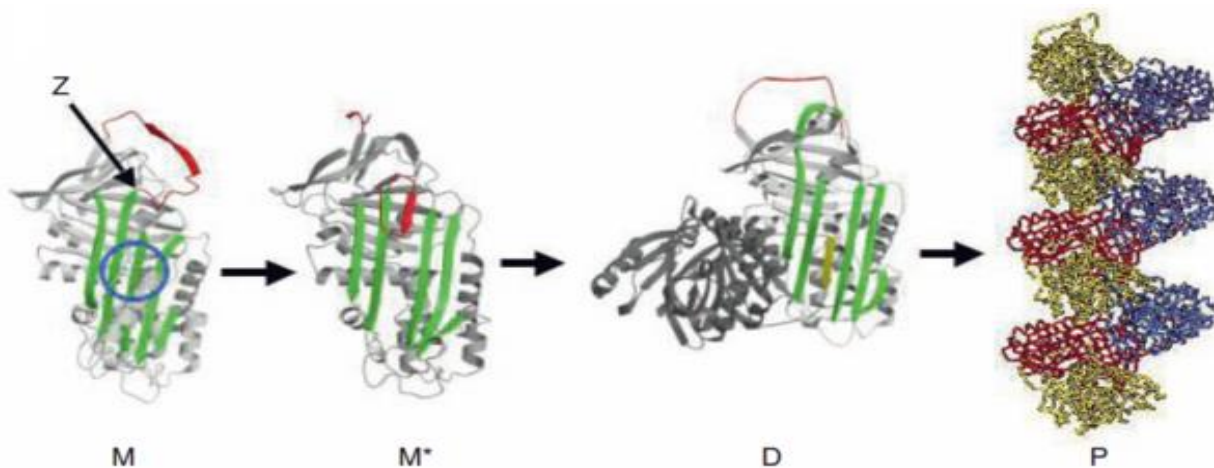
1.4.3. Polimorfizam alfa-1-antitripsina

AAT je kodiran visokopolimornim genom, koji kodira protein sa preko 120 otkrivenih alelskih varijanti, a nasleđivanje je kodinantno [102]. Većina varijanti su posledica tačkastih mutacija, koje dovode do supstitucije amino kiselina, pri čemu se ovakva promena odražava na elektroforetsku pokretljivost [103].

Proteinske varijante AAT su klasifikovane na osnovu elektroforetske mobilnosti, abecednim redom, u Pi klasifikacionom sistemu (eng. *Protease Inhibitor, Pi*), gde je PiZ varijanta najsporija (najbliža je katodi). Brzina kretanja varijanti AAT zavisi od naelektrisanja proteina koje se razlikuje zavisno od aminokiselinskog sastava. Najčešći oblici AAT su F (fast-brz), M (medium-srednji), S (slow-spor) i Z (very slow-vrlo spor) [104]. Izoelektrofokusiranjem ovog proteina (izoelektrična tačka proteina je pI 4,8), pri uskom opsegu pH gradijenta, na poliakrilamidnom gelu (4,2-4,9) moguće je identifikovati veliki broj AAT proteinskih varijanti. Prema koncentraciji u serumu i funkcionalnosti, AAT varijante se označavaju kao normalne, deficijentne, null i disfunkcionalne [72]. Najzastupljenija varijanta u populaciji bele rase, "wild type" je PiM (95%), sa najčešćim subtipovima M1 (Ala213Val), M2 (Arg101His) i M3 (Glu376Asp) i karakteriše se normalnom koncentracijom AAT u serumu [105, 106].

Klinički značajne varijante AAT su deficijentne, disfunkcionalne i null varijante. Najčešće deficijentne varijante, Z (Glu342Lys) i S (Glu264Val), su posledica tačkastih mutacija i karakterišu se redukovanim nivoom AAT u serumu [103]. Deficijencija AAT (AATD) se najčešće javlja kod PiZZ homozigota (Glu342Lys), sa nivoom cirkulišućeg AAT, svega 15% u odnosu na normalan nivo kod PiMM varijanti [107], dok je kod PiMZ heterozigota prisutno oko 50% od normalne koncentracije AAT [108]. Povezanost između urođenog deficita AAT i rane pojave emfizema, kod osoba mlađih od 50 godina, prvi put su opisali Laurell i Eriksson, 1963. godine, kada je uočen pad elektroforetske frakcije AAT, kao glavne globulinske frakcije humanog seruma [69].

Z varijanta AAT pokazuje tendenciju da tokom post-translacionih modifikacija u endoplazmatičnom retikulumu hepatocita formira polimere. Konformacione promene novosintetisanog AAT nastaju usled nestabilnosti centralne β -ploče, što rezultuje njenim otvaranjem i povezivanjem sa reaktivnom centralnom petljom drugog molekula AAT (mehanizam *loop-sheet* polimerizacija), formirajući najpre dimere, a potom i polimere (Slika 4.) [109, 110]. Ukoliko se prevaziđe kapacitet degradacije i uklanjanja polimera putem ubikvitin-proteaznog sistema u endoplazmatičnom retikulumu (eng. *ER-associated degradation, ERAD*), dolazi do njihovog nakupljanja i formiranja citotoksičnih PAS pozitivnih inkluzija (eng. *periodic acid-Schiff-stain positive inclusions*) koje oštećuju hepatocite [111, 112]. Nakupljanje polimera AAT u hepatocitima može dovesti do teških bolesti jetre, najčešće u pedijatrijskoj populaciji, ali i kod adultne populacije [113, 114, 115]. Prisustvo ekstarcelularnih polimera u plućima može izazvati proinflamatorni efekat, što sa istovremenim opadanjem antiproteazne zaštite doprinosi sklonosti rane pojave i progresije emfizema kod PiZZ homozigota [116, 117].



Slika 4. Polimerizacija alfa-1-antitripsina; M-osnovna struktura AAT, M*-intermedijalni proizvod, D-dimer AAT, P-polimer AAT. β -ploča-zelena boja, reaktivna centralna petlja-crvena boja. (Preuzeto iz Gholami & Hamzehlooe 2013) [118].

Prisustvo S varijante, za razliku od Z, uzrokuje blažu deficijenciju AAT u cirkulaciji, koja iznosi 50-60% od normalne vrednosti [102]. Varijanta S je posledica aminokiselinske zamene Glu264 sa Val264, koja dovodi do blage promene u terciarnoj strukturi, pri čemu ovakav protein podleže u manjoj meri intracelularnoj proteolizi [119]. Poluživot S varijante AAT u cirkulaciji je normalan, dok je konstanta brzine asocijacije sa elastazom neutrofila blizu normalne vrednosti [120, 121].

Prema epidemiološkoj studiji koja je obuhvatila podatke iz 97 zemalja, učestalost AATD fenotipova u svetskoj populaciji je 3,6%. Učestalost pojedinačnih deficijentnih fenotipova u odnosu na celokupan broj osoba sa AATD u svetu je za PI^*ZZ 0,1%, PI^*SZ 0,7%, PI^*SS 2,1%, PI^*MZ 22,3% i za PI^*MS 74,8% [108]. Deficijentne varijante, u koje spadaju PiM_{Malton} , $PiM_{MineralSpring}$, $M_{Procida}$, P_{Lowell} , su retko zastupljene, a učestalost kod Evropljana je niža od 0,01% [102].

Null varijante, poput $PiM_{Heerlen}$ i $PiQ0_{Lisbon}$ su uslovljene prevremenom pozicijom stop kodona, usled delecije nukleotida, insercije ili non-sense mutacije. Kod nosilaca ovakvih mutacija, koncentracija AAT nije detektibilna, što povećava rizik za rani razvoj plućnog emfizema [122]. Disfunkcionalne varijante AAT, iako se sintetišu u normalnim količinama, pokazuju abnormalne funkcije AAT, kao npr. smanjeno vezivanje PiF varijante za neutrofilnu elastazu usled konformacionih promena [123] ili $Pi_{Pittsburgh}$ varijanta sa potpuno izmenjenom biološkom funkcijom inhibitora trombina [124]. Prema studiji sprovedenoj u Srbiji, u kojoj je učestvovalo 50 ispitanika, potvrđeno je prisustvo dva retka genotipa kod dva učesnika, ZM_{malton} kod jednog i $ZQ0_{amersfoort}$ [125].

F varijanta nastaje zamenom arginina cisteinom na poziciji 223. Za razliku od M varijante, gde arginin na poziciji 223 stvara elektrostatičke interakcije sa bočnim lancem glutamata na poziciji 354 u aktivnom centru AAT molekula, kod F varijante ova interakcija je onemogućena [126]. Na ovaj način dolazi do konformacionih promena u strukturi F varijante AAT, što je verovatni uzrok opadanja konstante asocijacije AAT za neutrofilnu-elastazu. Serumaska koncentracija i funkcija F varijante AAT je blizu 80 % u odnosu na normalnu M varijantu [123, 127]. Pojedine studije su ispitivale značaj F varijante u kombinaciji sa nekom deficijentnom varijantom (Z i S) u pojavi HOBP [128, 129, 130]. U studiji koju su sprovedeli Sinden i saradnici [131] pokazano je da F varijanta, delovanjem elastaze, povećava osetljivost na oštećenje pluća, ali ne dovodi do pojave emfizema. Njihovi rezultati ukazuju da istovremena prisutnost F i deficijentne Z varijante može doprineti predispoziciji za razvoj emfizema.

1.4.4. Oksidacija metionina u aktivnom centru alfa-1-antitripsina

Pored urođene deficijencije AAT, sklonost prema oksidaciji aktivnog centra ovog proteina, dovodi do stečene funkcionalne deficijencije AAT. Humani AAT u svojoj strukturi sadrži devet metioninskih ostataka. Aktivni centar AAT je smešten na položaju Met³⁵⁸-Ser³⁵⁹ [98]. Oksidacija do metionin-sulfoksida se najčešće odvija na Met³⁵⁸ i Met³⁵¹, jer su ovi aminokiselinski ostaci smešteni na površini molekula, a samim tim više dostupni dejstvu prooksidanasa. Pretpostavlja se da ostalih sedam ostataka metionina u AAT nisu uključeni u antioksidativnu aktivnost [99]. Oksidativna modifikacija aktivnog centra proteina na položaju Met³⁵⁸ je glavni uzrok gubitka inhibitorne aktivnosti AAT prema neutrofilnoj elastazi [99]. Iako oksidativne promene AAT, izazvane duvanskim dimom, oksidansima ili enzimima iz inflamatornih ćelija (npr. mijeloperoksidaze), dovode do gubitka antiproteazne funkcije, antiinflamatorni efekti ovog proteina ostaju sačuvani [132].

Oksidacija metionina, dodavanjem jednog atoma kiseonika, dovodi do stvaranja metionin sulfoksida. Oksidacijom metionina mogu nastati dva diasteroizomera, metionin-R-sulfoksid (MetRO) i metionin-S-sulfoksid (MetSO) [133]. Dalja oksidacija nastalog metionin-sulfoksida dovodi do stvaranja metionin-sulfona i predstavlja ireverzibilan proces, koji usled nastale strukturne promene u proteinu može usloviti promenu ili gubitak njegove funkcije [134].

1.5. Sistem metionin sulfoksid reduktaza

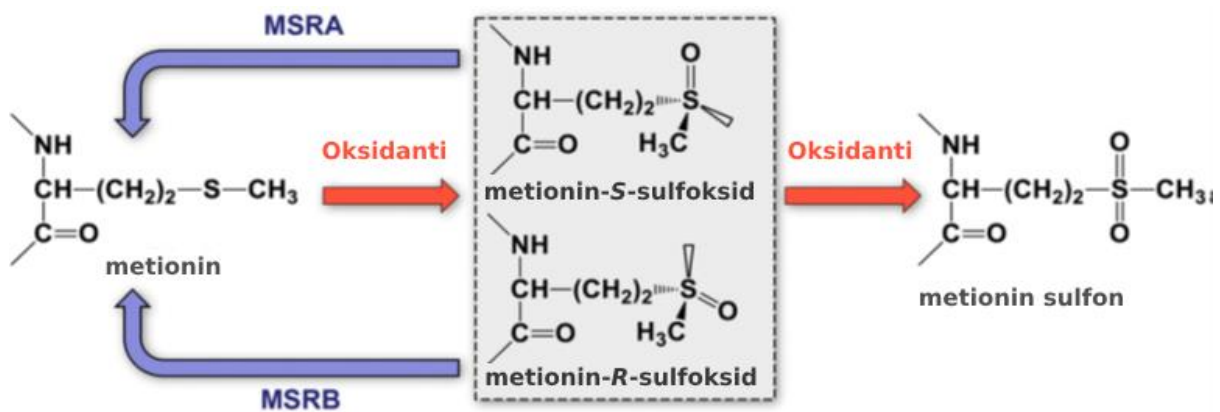
1.5.1 Struktura i izomerni oblici metionin sulfoksid reduktaza

MSRA je prisutan u citoplazmi, jedru i mitohondrijama. MSR sistem čine metionin sulfoksid reduktaza A (MSRA) i metionin sulfoksid reduktaza B (MSRB). MSRA redukuje izomer MetSO, dok MSRB redukuje izomer MetRO (Slika 5.) [133]. Postoje tri izoenzima MSRB: MSRB1 je prisutan u citoplazmi i jedru, MSRB2 u mitohondrijama i MSRB3 se nalazi u mitohondrijama i endoplazmatičnom retikulumu.

Ista aminokiselinska sekvenca u aktivnom centru MSRA (Gly-Cys-Phe-Trp-Gly) je visoko evolutivno očuvana, zastupljena u svim ispitivanim organizmima [135]. Analiza primarne strukture MSRA, pokazala je visok stepen homologije između različitih organizama, koja između *E. coli* i humanog iznosi 88 % [135]. Katalitički aktivan cistein se nalazi na N-terminalnom kraju α -heliksa proteina, što omogućava kontakt sa oksidovanim metionskim ostacima iz proteina koji sadrže oksidovani metionin. Cistein (Cys⁷⁴) u katalitičkom centru MSRA čoveka, pri redukciji oksidovanog metionina, formira disulfidnu vezu sa jednim od dva reciklirajuća cisteina sa C-terminalnog kraja enzima (Cys-220 i Cys-230) [136].

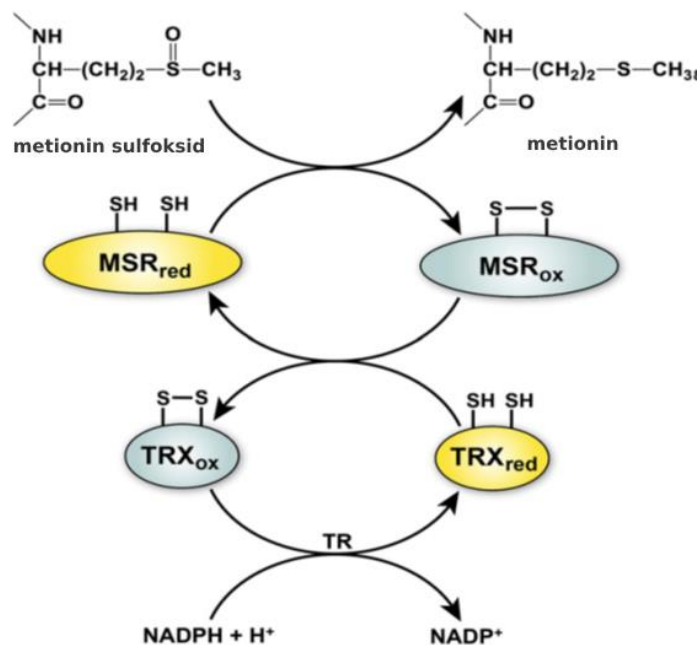
1.5.2 Mehanizam delovanja metionin sulfoksid reduktaze

Enzimski oporavak oksidovanih proteina je moguć ukoliko su proizvodi oksidacije amino kiseline koje sadrže sumpor, kao što su cistein i metionin. Metionin sulfoksid se redukuje nazad u metionin delovanjem enzima metionin-sulfoksid reduktaze (MSR) [137].



Slika 5. Šematski prikaz oksidacije metionina dejstvom slobodnih radikalov i redukcije nastalih proizvodov do metionina, dejstvom MSRA i MSRB enzima. (Preuzeto i adaptirano iz Gu et al. 2015) [134]

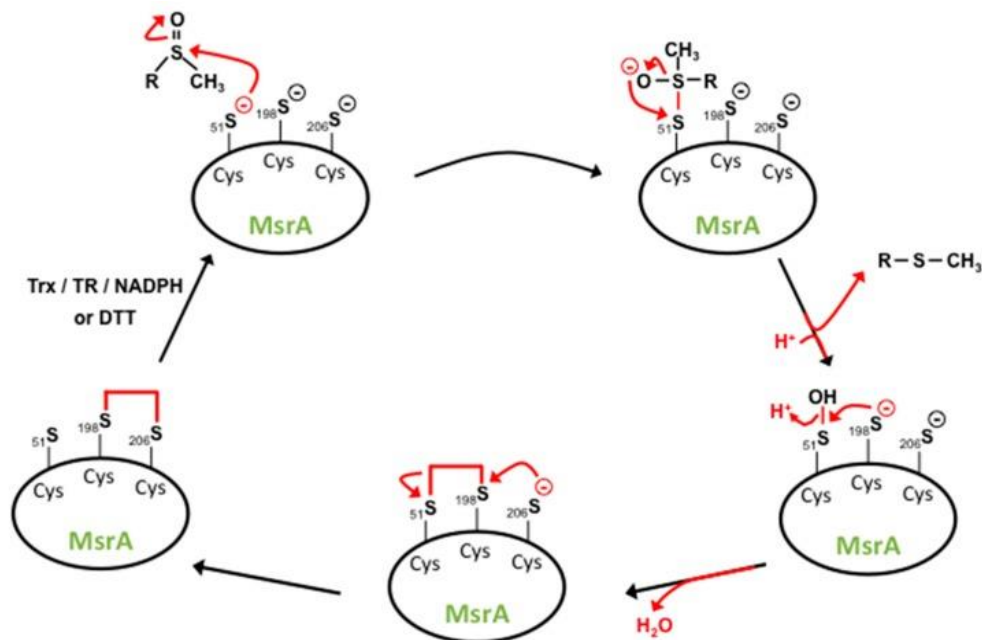
Nakon redukcije metionina, enzim MSR se vraća u redukovani oblik u prisustvu tioredoksin/tioredoksin-reduktaza sistema (Slika 6.) [137]. Tioredoksini (Trx) su mali ubikvitinski proteini sa dva redoks-aktivna cisteina (Cys-X-X-Cys), koji katalizuju reverzibilnu redukciju proteinskih disulfidnih mostova. Oksidovani tioredoksini se redukuju pomoću elektrona iz NADPH, delovanjem enzima NADPH-zavisine tioredoksin reduktaze (TR). Tioredoksin reduktaza, zajedno sa NADPH i tioredoksinom, čini tioredoksin sistem. Do sada su okarakterisana dva tioredoksin enzima. tioredoksin 1 (Trx1), koji je zastupljen u citoplazmi, a može se transportovati u jedro tokom oksidativnog stresa. Tioredoksin 2 (Trx2) koji je prisutan u mitohondrijama. Tioredoksin reguliše aktivnost mnogih transkripcionih faktora značajnih za redoks potencijal ćelije, poput Nrf-kapaB, Nrf2 i p53 [137].



Slika 6. Mehanizam redukcije oksidovanog metionina pomoću metionin-sulfoksid reduktaza Sistema (MSR) i tioredoksin sistema (TRX), u prisustvu NADPH koenzima. Aktivni redukovani oblici enzima označeni su plavom, a inaktivni oksidovani oblici označeni su žutom bojom. (Preuzeto i adaptirano iz Haiyong 2013) [138].

Na Slici 7. je prikazan katalitički mehanizam delovanja MSRA na primeru ovog enzima kod *E. coli*. Prvo dolazi do reakcije između katalitički aktivnog cisteina na poziciji 51 (Cys-51) u enzimu MSRA

i atoma sumpora iz oksidovanog metionina, pri čemu nastaje sulfenska kiselina. Nakon toga, oslobađa se metionin, a sulfenski međuproizvod sa cisteinom-198 (Cys-198) formira intramolekulski disulfidni most. Dalje dolazi do nukleofilnog napada na cistein-206 (Cys-206), dok prethodni cistein ostaje oslobođen, i nastaje novi intramolekulski disulfidni most između dva cisteina (Cys-198 i Cys-206). Poslednji korak podrazumeva redukciju disulfidne veze pomoću TRX sistema *in vivo*, ili drugog redukujućeg agensa *in vitro*, poput ditiotreitola (DTT) [136].



Slika 7. Mehanizam delovanja MSRA kod *E. coli*. Trx-tioredoxin reduktaza sistem; TR-tioredoxin reduktaza; DTT-ditiotreitola (Preuzeto iz Dos Santos 2018) [137]

1.5.3 Potencijalna povezanost sistema metionin sulfoksid reduktaze A sa HOBP

Metionin, zbog atoma sumpora, vrlo lako podleže oksidaciji što može dovesti do modifikacije ili gubitka aktivnosti enzima, koji u aktivnom centru imaju ovu aminokiselinu. Sistem MSR štiti proteine od ireverzibilnog oksidativnog oštećenja. Fiziološki je značajan za reparaciju brojnih enzima, poput proteaza i proteaznih inhibitora, metaboličkih enzima, proteina citoskeleta, citokina, *heat shock* proteina, hormona, hem proteina, proteina uključenih u imonodeficijenciju i proteina uključenih u nastanak neurodegenerativnih bolesti. *In vitro* studije su pokazale da enzimska redukcija oksidativno izmenjenog AAT, pomoću MSRA obnavlja antielastaznu aktivnost AAT [139].

Do sada je dokumentovano da je nefunkcionalna reparacija oksidativno modifikovanih proteina pomoću sistema metionin sulfoksid reduktaza uključena u patogenezu bolesti mozga, bolesti vezanih za starenje i vitiligo [140, 141, 142].

Gen za MSRA smešten je na hromozomu 8p23.1, dugačak je 375 kb i kodira protein sačinjen od 235 aminokiselina. Varijanta MSRA rs10903323, gde je „wild-type” (normalan) alel A, a mutirani alel G, smeštena je u intronu 3 MSRA gena. Ovaj polimorfizam MSRA gena bi mogao da utiče na količinu proteina MSRA što može da se odrazi na antioksidativnu zaštitu AAT i posredno na očuvanje antiproteazne aktivnosti AAT, redukovanjem metionina u aktivnom centru AAT. Kako je metionin u aktivnom centru AAT smešten na površini molekula, lako je podložan oksidaciji, ali takođe i redukciji. S obzirom da oksidacijom metionina nastaje metionin sulfoksid, njegovom redukcijom pomoću metionin sulfoksid reduktaze i tioredoksin sistema, aktivnost i struktura proteina mogu ostati sačuvani. Činjenica da MSRA redukcijom metionin sulfoksida u aktivnom centru AAT obnavlja njegovu antielastaznu aktivnost, ukazuje na potencijalni značaj varijanti MSRA u nastanku HOBP.

Do sada je u studijama otkrivena povezanost između MSRA polimorfizma rs10903323 i bolesti inflamatorne etiologije, kao što su reumatidni artritis i kardiovaskularne bolesti [134, 143, 144, 145].

Studije su pokazale da nosioci G alela MSRA rs10903323 imaju veći rizik za pojavu reumatoidnog artritisa i kardiovaskularnih oboljenja u odnosu na nosioce A alela [134, 144]. Pošto inflamacija ima značajnu ulogu u nastanku i progresiji HOBP, može se pretpostaviti potencijalna povezanost ove bolesti sa MSRA polimorfizmom rs10903323, koji je u prethodno navedenim studijama doveden u vezu sa stanjima koje u osnovi imaju inflamatornu etiologiju. Ispitivanje povezanosti između MSRA rs10903323 polimorfizma može da bude klinički značajno za procenu rizika za razvoj HOBP i progresiju bolesti.

2. Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je da se utvrdi klinički značaj alfa-1-antitripsina i metionin sulfoksid reduktaze A u nastanku i progresiji hronične opstruktivne bolesti pluća u populaciji Srbije, kao i potencijalna primena ovih biomarkera u dijagnostici i prognostici HOBP. Za postizanje definisanog cilja planirano je da se ispita sledeće:

- Utvrditi razlike u koncentraciji AAT, nivou oksidativno modifikovanog AAT i funkcionalnoj aktivnosti AAT između grupe pacijenata sa HOBP i zdravih ispitanika.
- Utvrditi uticaj pola, starenja i pušačkog statusa na koncentraciju AAT, nivo oksidativno modifikovanog AAT i funkcionalnu aktivnosti AAT kod pacijenata sa HOBP i zdravih ispitanika.
- Utvrditi korelaciju između funkcionalne aktivnosti AAT, nivoa oksidovano modifikovanog AAT i težine HOBP (GOLD 2, GOLD 3+4).
- Ispitati povezanosti između funkcionalne aktivnosti AAT i spirometrijskih parametara plućne funkcije (FEV1, FVC, FEV1/FVC) kod pacijenata sa HOBP, zavisno od pola i pušačkog statusa.
- Utvrditi povezanost oksidovano modifikovanog AAT i parametara funkcionalne aktivnosti AAT sa spirometrijskim parametrima plućne funkcije (FEV1, FVC, FEV1/FVC) kod pacijenata sa HOBP i zavisno od pušačkog statusa.
- Utvrditi razlike u frekvencijama fenotipova i alela AAT između zdravih ispitanika i pacijenata sa HOBP.
- Ispitati odstupanje distribucije fenotipova i alela AAT od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa HOBP
- Utvrditi uticaj fenotipa AAT (deficijentni/nedeficijentni) i pušenja na nivo oksidovanog AAT i funkcionalnu aktivnost AAT kod pacijenata sa HOBP.
- Utvrditi razlike u frekvencijama genotipova i alela MSRA rs10903323 između zdravih ispitanika i pacijenata sa HOBP.
- Ispitati odstupanje distribucije genotipova i alela MSRA rs10903323 od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa HOBP
- Ispitati pojedinačni i zajednički uticaj genskih varijanti MSRA rs10903323, prisustva HOBP i pušenja na nivo oksidovanog AAT i funkcionalnu aktivnost AAT
- Analizirati zajednički uticaj genskih varijanti MSRA rs10903323, pola, godina starosti i pušenja na spirometrijske parametre kod pacijenata sa HOBP.
- Ispitati razlike u distribuciji nosilaca kombinacije genskih varijanti MSRA rs10903323 i fenotipova AAT između pacijenata sa HOBP i zdravih ispitanika.

3. Materijal i metode

3.1 Ispitanici

Istraživanje je obuhvatilo analizu uzoraka 155 pacijenata sa potvrđenom dijagnozom hronične opstruktivne bolesti pluća, sakupljenih tokom 2014-2015.godine, u Kliničko-bolničkom centru "Zvezdara" i Kliničko-bolničkom centru "Kragujevac" na Klinici za pulmologiju. Kontrolnu grupu činili su uzorci 134 zdravih ispitanika, kod kojih je anamnezom i laboratorijskim rezultatima potvrđeno odsustvo bolesti, sakupljenih u Domu zdravlja "Stari grad", tokom 2014-2015. godine. Saglasnost za izvođenje studije dali su Etički komitet Kliničkog centra Kragujevac, Etički komitet Kliničko-bolničnog centra "Zvezdara", Etički komitet Doma zdravlja "Stari grad" i Etički komitet Farmaceutskog fakulteta (broj rešenja 622/3.).

Sakupljanje uzoraka je sprovedeno uz davanje pismene saglasnosti pacijenata i zdravih ispitanika, prema pravilima etičkih principa Helsinške deklaracije, a u skladu sa važećom lokalnom regulativom.

Dijagnostika HOBP je obuhvatila anamnezu, fizički pregled i spirometrijske testove za procenu plućne funkcije. Spirometrijskim testovima mereni su parametri: forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1), forsirani vitalni kapacitet (FVC) i indeks FEV1/FVC. Vrednosti merenja FEV1 i FVC su izražene kao % od predviđene vrednosti. Težina HOBP je definisana prema preporuci Globalne inicijative za hroničnu opstruktivnu bolest pluća (*GOLD-Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) [1] kao blaga HOBP (stadijum I), umerena HOBP (stadijum II), teška HOBP (stadijum III) i veoma teška HOBP (stadijum IV).

3.2 Materijal

U ovoj studiji, za analize korišćeni su uzorci venske krvi. Od svakog učesnika studije uzimani su uzorci u dve epruvete. Prva epruveta za uzorkovanje je bila bez antiokoagulansa, zapremine 5mL i druga sa etilen-diamino-tetrasirćetnom kiselinom (EDTA), kao antikoagulansom, zapremine 3mL. Uzorci krvi uzeti u epruvete bez antikoagulansa, nakon stajanja 30 min, centrifugirane su 10 minuta na 3000 rpm, nakon čega se izdvajao serum u sekundarne epruvete. Svi uzorci krvi i alikvotirani serumi čuvani su na -80 °C do početka analize.

3.3 Određivanje koncentracije alfa-1-antitripsina i parametara funkcionalne aktivnosti alfa-1-antitripsina

Koncentracija alfa-1-antitripsina i parametara funkcionalne aktivnosti alfa-1-antitripsina odrađena je u uzorcima seruma svih učesnika studije na biohemijskim analizatorima i primenom odgovarajućih jednačina.

3.3.1 Određivanje koncentracije alfa-1-antitripsina

Koncentracija alfa-1-antitripsina u uzorcima seruma ispitanika je određivana na automatskom analizatoru ADVIA[®] Chemistry System, upotrebom komercijalnog reagenasa, A-Alpha-1-Antitrypsin reagent (Siemens Healthcare Diagnostics), koji sadrži dve komponente, reagens 1 (R1) i reagens 2 (R2).

Sastav R1 komponente: polietilen-glikol (maksimum 6%), Tris/HCl pufer (pH 7,4; 20 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), natrijum azid (0,09%)

Sastav R2 komponente: kozija anti-humana-alfa-1-antitripsin antitela, Tris/HCl pufer (pH 7,4; 20 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), natrijum azid (0,09%)

Merenje je sprovedeno primenom imunoturbidimetrijskog testa. Koncentracija AAT u uzorku se određuje upotrebom standardne krive konstruisane uz pomoć apsorbancije standarda. Izvođenje testa podrazumeva dodatak uzorka seruma u reagens 1, koji sadrži polietilen-glikol i pufer. Sledi dodavanje reagensa 2, koji sadrži antihumani alfa-1-antitripsin. Formiranje antitelo-antigen kompleksa rezultira povećanjem turbiditeta. Turbiditet u završnoj tački reakcije određuje se merenjem apsorbance na 340 nm. Analitički opseg ove metode je od 0,05 do 5,40 g/L, dok je očekivana vrednost za odrasle 0,78 do 2,00 g/L.

3.3.2 Određivanje elastaza inhibitornog kapaciteta (EIC), specifične inhibitorne aktivnosti alfa-1-antitripsina prema elastazi i antielastazne aktivnosti

Elastaza inhibitorni kapacitet (eng. *Elastase Inhibitor Capacity*, EIC) je određen modifikovanom metodom po Bieath i saradnicima [146], koja je optimizovana na automatskom analizatoru Beckman Coulter Olympus AU400. Analiza je zasnovana na merenju aktivnosti elastaze korišćenjem N-sukcinil-L-alanil-L-alanil-L-alanil-p-nitroanilida (STAPNA) kao supstrata. Razblaženom serumu i kontroli (albumin 40 g/L) se doda tačno određena količina elastaze u višku koja reaguje sa AAT, kako je navedeno u Tabeli 1. Višak slobodne elastaze koji nije inhibiran aktivnošću AAT iz uzorka hidrolizuje supstrat, a porast apsorbance na 410 nm meri se kinetički na 1 minut tokom 5 minuta.

Hemikalije i reagensi:

- **Pufer 0,05M Tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS)/0,05M NaCl, pH 8,0:** pripremljen je rastvaranjem TRIS-a (0,607g) i NaCl (0,2925g) u 100 ml destilovane vode. pH vrednost je podešena na 8,0 pomoću rastvora HCl.
- **Rastvor enzima elastaze (c=1,25 mg/ml):** pripremljen je rastvaranjem 0,000625 g enzima elastaze (elastaza iz svinjskog pankreasa min. 200 U/mg, SERVA) u 0,5 ml pufera (0,05M TRIS/0,05M NaCl, PH=8,0). Rastvor enzima je pre upotrebe razblažen u odnosu 1:5 pomoću istog pufera. Rastvor je stabilan do 5 dana na -20 °C
- **Rastvor supstrata N-sukcinil-L-alanil-L-alanil-L-alanil-p-nitroanilid (STAPNA), SERVA, c=0,025M:** rastvor supstrata STAPNA pripremljen je rastvaranjem 0,0113 g supstance STAPNA u 1 mL 100% rastvora dimetil-sulfoksida (DMSO). Osnovni rastvor supstrata je razblažen 1:5 pomoću rastvarača DMSO, a potom je korišćen nakon razblaženja 1:2 sa DMSO. Rastvor je stabilan do 5 dana na -20°C
- **Pufer 0,05M TRIS/HCl, pH=8,0:** za 100 mL rastvora rastvoreno je 0,607 g TRIS-a u destilovanoj vodi i dodato 0,1225 mL HCl ($\rho=1,45$ g/mL). Pomoću HCl se podešava pH vrednost pufera.

Kontrola:

- **Albumin (c=40 g/L):** za 100 mL rastvora rastvoreno je 4 g albumina u 100 mL pufera 0,05 M TRIS/HCl pH=8,0

Uzorak:

- Serum razblažen u odnosu 1:5 pomoću pufera 0,05 M TRIS/HCL pH=8,0

Postupak određivanja elastaza inhibitornog kapaciteta u serumu na automatskom analizatoru prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Postupak određivanja elastaza inhibitornog kapaciteta

	Kontrola (µL)	Analiza (µL)
Elastaza	3	3
Albumin	12	-
Serum	-	12
Pufer	297	297
Komponente se pomešaju i inkubiraju 4 minuta na 37 °C		
STAPNA	25	25
Meri se promena apsorbance na 1 minut tokom 5 minuta na 410 nm, na 37 °C		

Izvođenje analize:

Razblaženom serumu i kontroli doda se pufer i elastaza. Smeša se inkubira na 37 °C tokom 4 minuta. Potom se dodaje supstrat STAPNA. U kontroli se dobija ukupna aktivnost dodatog enzima jer ne postoji inhibitor elastaze. U uzorku seruma meri se preostala aktivnost elastaze nakon reakcije sa AAT. Obzirom da se enzimska reakcija odigrava brzo, odmah po dodatku supstrata merena je promena apsorbance na 1 minut tokom 5 minuta na talasnoj dužini od 410 nm. Određivanje elastaza inhibitornog kapacitet (EIC) je obavljeno na automatskom analizatoru Olympus AU 400 (Slika 8.).

The screenshot shows the 'General' tab of the Olympus AU400 software interface. The test name is 'EIC'. The sample type is 'Serum' and the operation is set to 'YES'. The sample volume is 12.0 µL with a dilution of 0. Reagents R1 and R2 have volumes of 300 µL and 25 µL respectively, both with dilutions of 0. The wavelength is set to 410 nm (Pri) and 480 nm (Sec). The method is 'RATE' and the reaction slope is '+'. Measuring points are set to 0 for both first and second points, with last points at 27 and 10. The dynamic range is from -999999.9 to 999999.9. The correlation factor is A: 1.000000 and B: 0.000000. The on-board stability period is blank. At the bottom, there are buttons for Help, Exit, Print, Set, and Test No.

Slika 8. Aplikacija za određivanje EIC na analizatoru Beckman Coulter Olympus AU400

Izračunavanje elastaza inhibitornog kapaciteta

$$EIC = \Delta A / \min_{kontrola} - \Delta A / \min_{uzorak}$$

$\Delta A / \min$ - prosečna promena promena apsorbance u toku 1 minuta

$$EIC (kU) = \Delta A / \min \times 10^6 / \epsilon \times d \times UZ / ZA \times F$$

ϵ -molarni ekstinkcioni koeficijent proizvoda koji nastaje u reakciji, za p-nitroanilin $\epsilon_{410nm} = 8,8 \times 10^6 \text{ mM}^{-1}$

d-dužina optičkog puta (1 cm)

UZ-ukupna zapremina reakcione smeše (337 μ L)

ZA-zapremina uzorka (seruma) (12 μ L)

F-korekcionni faktor zbog inicijalnog razblaženja seruma 1:5 (F=5)

EIC (kU)= $\Delta A/\text{min} \times 15,956$

Izračunavanje specifične inhibitorne aktivnosti alfa-1-antitripsina prema elastazi (SIA-elastaza) i antielastazne aktivnosti alfa-1-antitripsina

SIA-elastaza (kU/g)=EIC (kU)/AAT (g/L)

Antielastazna aktivnost AAT= $[1-(\Delta EIC_{\text{uzorak}}/\Delta EIC_{\text{kontrola}})] \times 100$;

3.3.3 Određivanje tripsin inhibitornog kapaciteta (TIC), specifične inhibitorne aktivnosti alfa-1-antitripsina prema tripsinu (SIA-tripsin) i antitripsinske aktivnosti

Za određivanje tripsin inhibitornog kapaciteta (eng. *Trypsin Inhibitory Capacity*, TIC) primenjena je metoda po Schwertu i Takenaku koja je modifikovana i aplikovana na analizator Olympus AU400 [147]. N- α -benzoil-dL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) korišćen je kao supstrat za merenje aktivnosti tripsina. Uzorku seruma i kontrole dodaje se tačno određena količina enzima u višku. Enzim reaguje sa AAT iz seruma. Višak slobodnog tripsina koji nije inhibiran delovanjem AAT iz uzorka hidrolizuje supstrat. Porast apsorbance na 410 nm meri se nakon lag faze (60 sekundi) na 1 minut tokom 5 minuta.

Hemikalije i reagensi:

- **Pufer 0,05M TRIS/HCl, pH=8,0:** za 100 mL rastvora rastvoreno je 0,607 g TRIS-a u destilovanoj vodi i dodato 0,1225 mL HCl ($\rho=1,45$ g/mL). pH vrednost pufera 8,0 se podešava pomoću HCl.
- **HCl 0,001 mol/L:** pripremljen je rastvaranjem 0,00304 ml koncentrovane HCl ($\rho=1,2$ g/ml) u 100 ml destilovane vode.
- **Rastvor enzima tripsina:** pripremljen je rastvaranjem 0,001 g enzima tripsina (tripsin iz goveđeg pankreasa, $\geq 10,000$ BAEE units/mg protein, Sigma) u 10 ml 0,001 mol/L HCl. Rastvor je stabilan sedam dana na +4 °C.
- **Rastvor supstrata BAPNA, c=40 mmol/L:** pripremljen je rastvaranjem 0,17396 g supstrata BAPNA (N- α -benzoil-dL-arginin-p-nitroanilid x HCl-C₁₉H₂₂N₆O₄. HCl, Mr=434,9 g/mol, Serva) u 10 ml DMSO-a. Rastvor je stabilan sedam dana na +4 °C.

Kontrola:

- **Albumin (c=40 g/L):** za 100 mL rastvora rastvoreno je 4 g albumina u 100 mL pufera 0,05 M TRIS/HCl pH=8,0.

Uzorak:

- Serum razblažen u odnosu 1:5 pomoću pufera 0,05 M TRIS/HCl pH=8,0.

Postupak određivanja elastaza inhibitornog kapaciteta u serumu prikazan je u Tabeli 2.

Tabela 2. Postupak određivanja tripsin inhibitorynog kapaciteta

	Kontrola (µL)	Analiza (µL)
Tripsin	20	20
Albumin	4	-
Serum	-	4
Pufer	280	280
Komponente se pomešaju i inkubiraju 4 minuta na 37 °C		
BAPNA	25	25
Nakon “lag” faze (60 sekundi) meri se promena apsorbance na 1 minut (5 minuta) na 410 nm, na 37°C		

Izvođenje analize:

Uzorku seruma i kontrole dodat je pufer i enzim. Smeša se inkubira 4 minuta na 37 °C. U uzorku seruma tripsin je inhibiran prisutnim AAT, dok u kontroli ne postoji inhibitor enzima. Nakon inkubacije dodaje se supstrat BAPNA sa kojim reaguje preostali tripsin iz seruma i celokupan tripsin iz kontrole. Po dodavanju supstrata BAPNA, nakon isteka “lag” faze koja traje 60 sekundi, nastaje proizvod reakcije supstrata i tripsina p-nitroanilin i meri se promena apsorbance na 410 nm na 1 minut tokom 5 minuta.

Određivanje tripsin inhibitorynog kapaciteta (TIC) vršeno je na automatskom analizatoru Olympus AU 400 (Slika 9.).

The screenshot shows the software interface for the Olympus AU400 analyzer. The 'General' tab is active, and the test name is set to 'TIC'. The sample type is 'Serum' and the operation is 'YES'. The interface includes fields for Sample Volume (4.0 uL), Reagents R1 and R2 volumes (300 uL and 25 uL), Wavelength (410 nm), Method (RATE), Reaction slope (+), Measuring points (First and Last for both points), Linearity (%), and Dynamic range (L and H values). There are also buttons for Help, Exit, Print, Set, and Test No.

Slika 9. Aplikacija za određivanje TIC na analizatoru Beckman Coulter Olympus AU400

Izračunavanje tripsin inhibitorynog kapaciteta (TIC)

$$TIC = \Delta A / \min_{kontrola} - \Delta A / \min_{uzorak}$$

$\Delta A/\text{min}$ - prosečna promena promena apsorbance u toku 1 minuta

$$\text{TIC (kU)} = \Delta A/\text{min} \times 10^6 / \epsilon d \times \text{UZ}/\text{ZA} \times F$$

ϵ -molarni ekstinkcioni koeficijent proizvoda koji nastaje u reakciji, za p-nitroanilin $\epsilon_{410\text{nm}} = 8,8 \times 10^6 \text{ mMcm}^{-1}$

d-dužina optičkog puta (1 cm)

UZ-ukupna zapremina reakcione smeše (329 μL)

ZA-zapremina uzorka (seruma) (4 μL)

F-korekcionni faktor zbog inicijalnog razblaženja seruma 1:5 (F=5)

$$\text{TIC (kU)} = \Delta A/\text{min} \times 46,733$$

Izračunavanje specifične inhibitorne aktivnosti alfa-1-antitripsina prema tripsinu (SIA-tripsin) i antitripsinske aktivnosti alfa-1-antitripsina

$$\text{SIA-tripsin (kU/g)} = \text{TIC (kU)}/\text{AAT (g/L)}$$

$$\text{Antitripsinska aktivnost AAT} = [1 - (\Delta\text{TIC}_{\text{uzorak}}/\Delta\text{TIC}_{\text{kontrola}})] \times 100$$

3.3.4 Određivanje oksidovanog alfa-1-antitripsina

Prema modifikovanoj metodi Beatty i saradnika [148] određen je oksidativno modifikovani alfa-1-antitripsin (oksidovani AAT) u serumu.

Princip određivanja:

Metoda za merenje oksidovanog AAT se zasniva na merenju razlike između inhibitorne aktivnosti normalnog i oksidovanog AAT prema tripsinu i elastazi. Normalni AAT inhibira tripsin i elastazu, koji su poreklom od svinje. Oksidovani AAT gubi svoju inhibitornu aktivnost prema elastazi svinjskog porekla i zadržava mali deo kapaciteta da inhibira tripsin, iako konstanta asocijacije za tripsin značajno opada. Odnos Tripsin inhibitornog kapaciteta (TIC) prema Elastaza inhibitornom kapacitetu (EIC) kod potpuno redukovano AAT trebalo bi da bude konstanta:

$$(1) \text{ (TIC)}/\text{ (EIC)} = K_R.$$

Sa oksidacijom AAT dolazi do promene ovog odnosa do vrednosti K_O :

$$(2) \text{ (TIC)}/\text{ (EIC)} = K_O.$$

U uslovima kada AAT podleže oksidaciji, ovaj odnos se menja do neke više vrednosti, K_O , proporcionalno delimičnom gubitku EIC (označenom kao X):

$$(3) \text{ (TIC)}/\text{ (EIC)} - X(\text{EIC}) = K_O.$$

Odnos $\text{(TIC)}/\text{(EIC)}$ biće viši sa porastom nivoa oksidacije AAT, dok će u slučaju potpune oksidacije AAT dostići beskonačnost. Zamenom K_R iz jednačine (1) u jednačinu (3), dobija se:

$$(4) K_R/1-X = K_O.$$

Ukoliko je odnos K_R poznat iz redukovano uzorka seruma i odnos K_O je izmeren, nivo oksidacije AAT u nepoznatom uzorku može biti određen korišćenjem prethodnih jednačina:

$$(5) X = 1 - K_R/K_O.$$

Odnosno, kako X predstavlja oksidovani AAT, dobija se:

$$(6) \text{ Oksidovani AAT} = 1 - K_R/(\text{TIC}/\text{EIC}).$$

Kako se, primenom navedene metode za potpunu redukciju AAT, za vrednost K_R dobije 1,27, zamenom u prethodnoj jednačini dobija se:

$$(7) \text{ Oksidovani AAT} = 1 - (1,27 / \text{TIC}_{\text{uzorak}} / \text{EIC}_{\text{uzorak}}).$$

Procenat oksidovanog AAT dobija se množenjem prethodno dobijenog rezultata sa 100:

$$(8) \text{ Oksidovani AAT (\%)} = [1 - (1,27 / \text{TIC}_{\text{uzorak}} / \text{EIC}_{\text{uzorak}}) \times 100].$$

Procenjena koncentracija oksidovanog se AAT računa prema jednačini:

$$(9) \text{ Oksidovani AAT (g/L)} = [\text{Oksidovani AAT (\%)} \times \text{AAT (g/L)}] / 100.$$

Hemikalije i reagensi:

1. Humani alfa-1-antitripsin (Alpha₁-Proteinase Inhibitor (Human), Prolastin[®], Telecris Biotherapeutics, Inc. USA). Sterilni, liofilizovani preparat prečišćenog humanog alfa-1-antitripsina, dobijen iz pula humane plazme.
2. N-chlorosuccinimide, Mw 133,53 (Sigma-Aldrich).
3. 2-Mercaptoethanol, Mw 78,13 (Sigma-Aldrich).

Oksidacija prečišćenog humanog AAT (Prolastin[®]) pomoću N-hlorsukcinimida

Prema metodi Moraga i Janciauskiene [149] izvršena je potpuna oksidacija prečišćenog humanog AAT (Prolastin[®]) pomoću oksidansa N-hlorsukcinimida (N-chlorosuccinimide). Molarni odnos između humanog AAT i N-hlorsukcinimida je bio 1:25. Pripremljen je 1 mL sledeće smeše 0,00015 g N-hlorsukcinimida i 0,002 g prečišćenog humanog AAT (Prolastin[®]) u 0,1 M puferu TRIS-HCl pH 8,0. Ova smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 30 minuta. Oksidovani AAT je prečišćen pomoću kolone Sephadex G-25, koja je prethodno ekvilibrirana rastvorom 50 mM NH₄HCO₃. Nakon prečišćavanja uzorak oksidovanog AAT se centrifugira, pre određivanja parametara TIC i EIC.

Redukcija prečišćenog humanog AAT (Prolastin[®]) pomoću 2-Merkaptoetanol

Prema metodi Jori i saradnika [150] izvršena je potpuna redukcija prečišćenog humanog AAT (Prolastin[®]) pomoću redukcionog sredstva 2-Merkaptoetanol (2-Mercaptoethanol). Pripremljen je 1 mL sledeće smeše: 50 µL i 0,002 g prečišćenog humanog AAT (Prolastin[®]) u 0,1 M puferu TRIS-HCl pH 8,0. Priprema smeše i reakcija redukcije se odvijala 24h u struji azota. Redukovani AAT je prečišćen pomoću kolone Sephadex G-25, koja je prethodno ekvilibrirana rastvorom 0,2 M sirćetne kiseline. Nakon prečišćavanja uzorak redukovanog AAT se centrifugira, pre određivanja parametara TIC i EIC.

3.4 Metoda za određivanje fenotipa alfa-1-antitripsina-izoelektrofokusanje

Metoda izbora za fenotipizaciju AAT je izoelektrofokusanje na ultra tankom poliakrilamidnom gelu, pri pH od 4,2 do 4,9.

Reagensi korišćeni za izvođenje izoelektrofokusanja:

Poliakrilamidni gel (Blank Focus Gel 24S, Serva)

Rastvor ditiotreitola: rastvori se 0,0077 g ditiotreitola (DL-Dithiothreitol, C₄H₁₀O₂S₂, Mr=154,25 g/mol, Sigma Aldrich) u 1ml redestilovane vode. Rastvor se priprema ex tempore.

Rastvor za rehidraciju gela: pomeša se 4 ml komercijalnog rastvora za rehidraciju (SERVALYT™, 40% (w/v) solution in water, pH 4,2-4,9), 5 ml glicerola i doda redestilovane vode do 50 ml. Rastvor se može upotrebiti dva puta. Čuva se na sobnoj temperaturi najduže 7 dana.

Rastvor za fiksiranje: rastvori se 17,3 g sulfosalicilne kiseline i 57,5 g trihlorsirćetne kiseline u redestilovanoj vodi i dopuni u normalnom sudu do 500 ml. Rastvor je stabilan 1 mesec na sobnoj temperaturi.

Rastvor za odbojavanje: pomeša se 300 ml metanola i 100 ml glacijalne sirćetne kiseline sa 800 ml redestilovane vode. Rastvor je stabilan 1 mesec na sobnoj temperaturi.

Rastvor za bojenje CBB-R-250 (0,1%): rastvori se 0,2 g boje CBB-R-250 (Coomasie^R Brilliant Blue R 250, C₄₅H₄₄N₃O₇S₂-Na, Mr=826,00 g/mol, Cat.No.17525, SERVA) u 200 ml rastvora za odbojavanje zagrevanjem na 60°C tokom 1-2 sata. Nakon rastvaranja potrebno je da se rastvor ohladi, a potom profiltrira. Rastvor je stabilan 1 mesec na sobnoj temperaturi.

Rastvor za impregnaciju, 5% (w/v) rastvor glicerola: 50 g glicerola se rastvori u redestilovanoj vodi i dopuni do 1000 ml.

Aparatura za izvođenje izoelektrofokusanja

Izoelektrofokusanje je izvođeno na aparaturi Pharmacia LKB koju čine: kada Multiphor II, termostat LKB 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator i ispravljač Electrophoresis Supply EPS 3500 XL, Pharmacia.

Priprema uzoraka za izoelektrofokusanje

Uzorci seruma se tretiraju redukujućim sredstvom, ditiotreitolom (DTT), koji raskida disulfidne veze između tiolnih grupa cisteinskih rezidua u molekulu AAT.

Rastvor DTT i serum se mešaju u odnosu 1:1 i potrebno je da se ova mešavina pripremi 1-1,5 sat pre nanošenja uzoraka na gel.

Izvođenje elektroforeze

Za elektroforezu koristi se komercijalni poliakrilamidni gel (Blank Focus Gel 24S, Kat.broj 43413, Serva) dimenzije 250 x 115 x 0,65 mm. Gel za elektroforezu se rehidrira 2 sata, uz povremeno blago pomeranje posude, u rastvoru za rehidraciju. Rastvor za rehidraciju sadrži smešu amfolita koja obezbeđuje formiranje pH gradijenta. Na ploču za hlađenje nanese se rastvor za hlađenje (Cooling Fluid, Serva). Gel se potom postavlja na sistem za elektroforezu. Uslovi pod kojima se izvodi izoelektrofokusanje prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Uslovi za izvođenje elektroforeze

Faza	Napon (V)	Struja (mA)	Jačina (W)	Vreme (min)	Proces
1	1000	50	10	30	Predfokusiranje bez uzoraka
2	500	30	10	30	Ulazak uzoraka u gel
3	1500	18	20	90	Fokusiranje
4	2000	15	25	30	Izoštavanje frakcija

Najpre se izvodi faza predfokusiranja, koja traje 30 min, pod definisanim uslovima i konstantnom temperaturom od 8°C, tokom koje dolazi do formiranja pH gradijenta na gelu. Pri izvođenju elektroforeze, elektrode direktno naležu na površinu gela duž njegovih ivica. Nakon predfokusiranja, nanose se uzorci u bazene na gelu u količini od 10 µl. Uzorci se kreću od katode prema anodi. Na jedan gel moguće je naneti 24 uzorka. Elektroforeza se nastavlja tokom 2 sata i 30 minuta, pod tačno definisanim uslovima (Tabela 3.). Po završetku elektroforeze, gel se fiksira 20 minuta, što omogućava da se frakcije na gelu denaturacijom fiksiraju. Zatim se gel ispira sredstvom za odbojavanje 2 puta po 1 minut, a potom se vrši bojenje gela tokom 45 minuta pomoću boje Coomassie Brilliant Blue R 250®. Odbojavanje pozadine gela, pomoću rastvora za odbojavanje, se izvodi potapanjem gela i preko noći. Nakon odbojavanja, gel se impregnira 5% (w/v) rastvorom glicerola tokom 5 minuta i ostavi da se suši na sobnoj temperaturi, nakon čega su frakcije jasno uočljive na gelu (Slika 13.). Identifikaciju fenotipova su nezavisno obavile dve osobe.

3.5 Metode za određivanje genskih varijanti enzima metionin slufoksid reduktaze A

3.5.1 Izolacija DNK

Genomska DNK je izolovana iz nuklearnih ćelija periferne krvi upotrebom komercijalnog kita Quick-DNA™ Universal kit (Zymo research, The Epygenetics Company), prema uputstvu proizvođača:

- 200 µL uzorka je pipetirano u mikrotubu i dodato 200 µL lizirajućeg pufera (BioFluid&Cells Buffer) i 20 µL Proteinaze K. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i potom inkubirana 10 minuta na 55 °C.
- Smeši je dodat pufer koji omogućava vezivanje DNK za kolonu (Genomic Binding Buffer) i ponovo je mešana na vorteksu 15 sekundi.
- Smeša je prenet na kolonu (Zymo-Spin™IIC-XL Column) sa novom mikrotubom za sakupljanje sadržaja i centrifugirana 1 minut na 12000 obr/min. Mikrotuba sa sakupljenom tečnošću je zamenjena novom.
- U kolonu je dodato 400 µL pufera za predispiranje (DNA pre-wash Buffer) i centrifugirano na 12000 obr/min u trajanju od 1 minut. Sakupljena tečnost iz mikrotube je odbačena.
- U kolonu je dodato 700 µL pufera za ispiranje (g-DNA Wash Buffer) i centrifugirana je 1min na 12000 obr/min. Sakupljena tečnost iz mikrotube je odbačena.
- Potom, za dodatno uklanjanje nečistoća sa DNK, u kolonu se dodaje 200 µL pufera za ispiranje (g-DNA Wash Buffer) i centrifugira 1 minut na 12000 obr/min. Mikrotuba sa sakupljenim sadržajem se odbacuje.
- Kolona je prebečena u epruvetu za sakupljanje eluata i dodato je 50 µL sterilne vode direktno na matriks kolone. Kolona je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi, a potom centrifugirana na 12000 obr/min u trajanju 1 minut.
- Nakon centrifugiranja kolona je odbačena, a u epruveti je ostao rastvor DNK, koji se može odmah koristiti ili čuvati na -20 °C do dalje upotrebe.

3.5.2 Reakcija lančanog umnožavanja DNK polimerazom

Za detekciju genskih varijanti enzima MSRA korišćene su reakcija lančanog umnožavanja polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i metoda polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP). Sekvence graničnika (prajmera), oligonukleotida, koji su korišćeni u ovom istraživanju u reakciji lančanog umnožavanja DNK (PCR) prikazane su u Tabeli 4.

Tabela 4. Sekvence graničnika

Naziv graničnika	Sekvenca graničnika
MSRA ForPSM	5'-GAATAAATAAATGGTGCTGGCCCACACAG-3'
MSRA RevPSM	5'-CCAGTCCCTAGATGGAATCCCACATG-3'

Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom omogućava *in vitro* umnožavanje određenog fragmenta DNK, koji se definiše pomoću graničnika. Graničnici su oligonukleotidi koji se komplementarno vezuju za delove DNK.

Reagensi:

- Pufer-10X reakcioni *Taq* Buffer A sa 1.5mM Mg (FastGene, Nippon Genetics Europe)
- Smeša nukleotidnih baza-10mM dNTP Mix (Kapa Biosystem)
- Graničnik MSRA RevPSM (Invitrogen by Fisher Scientific)
- Graničnik MSRA ForPSM (Invitrogen by Fisher Scientific)
- Polimeraza 5 U/ μ l *Taq* polimeraza 500 U (FastGene, Nippon Genetics Europe)
- Sterilna voda

Tabela 5. Sastav smeše za lančano umnožavanje DNK sekvence iz uzorka periferne krvi

Komponenta reakcione smeše	Potrebna zapremina po uzorku (μ l)
10X reakcioni <i>Taq</i> Buffer A sa 1.5mM Mg	5
10mM dNTP Mix	1
Graničnik MSRA RevPSM 10pmol	1
Graničnik MSRA ForPSM 10pmol	1
5 U/ μ l <i>Taq</i> polimeraza 500 U	0.2
Uzorak periferne krvi	1
Sterilna voda	40,8
Ukupna zapremina reakcione smeše (μ l)	50

Uslovi izvođenja reakcije lančanog umnožavanja odabranog fragmenta MSRA gena iz uzorka periferne krvi prikazani su u Tabeli 6.

Fragmenti dobijeni lančanim umnožavanjem DNK su detektovani na 2% agaroznom gelu pomoću etidijum-bromida i UV-svetla. Na agaroznom gelu, umnoženi fragment MSRA gena imao je dužinu 190 bp.

Tabela 6. Uslovi izvođenja reakcije lančanog umnožavanja DNK sekvence iz uzorka periferne krvi

Faza reakcije	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Broj ciklusa
Razlaganje ćelija krvi	97	3	3
	55	2	
Pauza za dodavanje polimeraze			
Denaturacija	94	0,5	30
Hibridizacija	56	0,5	
Elongacija	72	0,5	
Terminalana elongacija	72	5	1

Za manji broj uzoraka iz kontrolne grupe, za koje proces umnožavanja DNK iz periferne krvi kao biološkog materijala nije bio uspešan, korišćeni su uzorci izolovane DNK. Sastav smeše i uslovi izvođenja lančanog umnožavanja sekvenci izolovane DNK prikazani su u Tabelama 7 i 8.

Tabela 7. Sastav smeše za lančano umnožavanje DNK sekvence iz uzorka izolovane DNK

Komponenta smeše	Potrebna zapremina po uzorku (µl)
10X reakcioni <i>Taq</i> Buffer A sa 1.5mM Mg	5
10mM dNTP Mix(Kapa Biosystems)	1
Graničnik MSRA RevPSM 10pmol	1
Graničnik MSRA ForPSM 10pmol	1
5 U/µl <i>Taq</i> polimeraza 500 U	0,2
Uzorak izolovane DNK	10
Sterilna voda	31,8
Ukupna zapremina reakcione smeše (µl)	50

Tabela 8. Uslovi izvođenja reakcije lančanog umnožavanja DNK sekvence iz uzorka izolovane DNK

Faza reakcije	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija DNK	95	5	1
Denaturacija	94	0,5	30
Hibridizacija	56	0,5	
Elongacija	72	0,5	
Terminalana elongacija	72	5	1

3.5.3 Elektroforeza u gelu od agaroze

Za detekciju i analizu nukleinskih kiselina najčešće se primenjuje elektroforeza na agaroznom gelu. Elektroforeza u gelu od agaroze je rađena za detekciju fragmenata dobijenih u PCR reakciji, kao i za detekciju produkata digestije.

Priprema agaroznog gela

- U 100ml TAE pufera (40mM Tris, 20mM natrijum acetat, 1mM Na₂EDTA) dodata je određena količina agaroze, Sigma (2% gel - 2g agaroze; 3% gel – 3g agaroze), a potom smeša se zagreva do ključanja da bi se agarozna rastvorila u puferu
- Rastvor agaroze se ostavi da se ohladi do 50 °C, a potom se doda rastvor etidijum-bromida u koncentracij od 1µg/mL
- Rastvor se potom izliva u kalupe na koje su prethodno postavljeni češljevi koji obezbeđuju formiranje bunarića u koje se kasnije unosi uzorak. Gel polimerizuje na sobnoj temperaturi u periodu od 30 min
- Kada se završi polimerizacija, češljevi se uklone, kalup sa gelom se postavi u kadicu i dolije se TAE pufer 0,5 cm iznad površine gela
- Na pripremljeni gel se mogu naneti uzorci za analizu.

Elektroforeza se odvija u TAE puferu, pri naponu od 7-10 V/cm. Za praćenje dužine DNK fragmenta upotrebljava se DNK marker (50 bp DNA Ladder). Vizuelna detekcija DNK fragmenata je obezbeđena dodavanjem etidijum-bromida i osvetljavanjem gela UV lampom, pri čemu dolazi do fluoroscencije. Intenzitet fluoroscencije je proporcionalan količini DNK u određenoj traci na gelu. Vizuelna detekcija fragmenata se radi pomoću transluminatora (BioDocAnalyze) i izgled gela se dokumentuje CCD kamerom.

3.5.4 Digestija produkata PCR reakcije

Digestija DNK fragmenata dobijenih PCR metodom sprovedena je pomoću restrikcionog enzima pri kontrolisanim temperaturnim uslovima.

Sastav smeše za digestiju je prikazan u Tabeli 9. Digestija se odigrava na 37 °C, preko noći. Detekcija produkata digestije se vrši na 3% agaroznom gelu, a ukoliko je prinos PCR uzorka bio mali koristi se poliakrilamidni gel.

Reagensi:

- Enzim endonukleaza- *Adel* (DraIII) 500U, 10 U/µl (Thermo Scientific)
- Pufer-10 x Buffer G (with BSA) (Thermo Scientific)
- Sterilna voda

Tabela 9. Sastav smeše za digestiju DNK

Komponenta smeše	Potrebna zapremina po uzorku (µl)
<i>Adel</i> (DraIII) 500U, 10 U/µl	0.33
10 x Buffer G (with BSA)	2
PCR smeša	10
Sterilna voda	8

Ukoliko je prisutan A alel u umnoženom fragmentu neće postojati mesto sečenja restrikcionim enzimom i dobijeni PCR fragment od 190bp, neće biti isečen. Prisustvo G alela uvodi restrikciono mesto za odabrani enzim i PCR fragment se seče na dva dela dužine 165 i 25 bp.

3.5.5 Elektroforeza u gelu od poliakrilamida

Poliakrilamidni gel se, pored agaroznog gela, takođe primenjuje za detekciju i analizu nukleinskih kiselina. U ovoj studiji, za uzorke čiji je prinos PCR reakcije bio nizak, produkti digestije su detektovani korišćenjem 10 % poliakrilamidnog gela.

Priprema poliakrilamidnog gela:

- Za određenu koncentraciju i debljinu gela, pomešane su određene količine akrilamida (akrilamid i N,N'-metilenbisakrilamid u odnosu 29:1), Tris boratnog (TBE) pufera (100 mM Tris, 83 mM borne kiseline, 1 mM Na₂EDTA, pH 8), 0,1 % APS-a (amonijum-persulfat) i 1 µL/ml TEMED-a (tetrametil-etilendiamin).
- U kalup za gel, u koji su postavljeni češljevi, izlivena je smeša za gel. Gel je ostavljen da polimerizuje na sobnoj temperaturi.
- Po završetku polimerizacije, češljevi se uklone, kalup je prenet u kadicu za vertikalnu elektroforezu u koju je naliven TBE pufer. Potom se na gel nanose uzorci za analizu.

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu se odvija u TBE puferu pri naponu od 10 V/cm u trajanju od 1-1,5h. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćen je DNK marker (50 bp DNA Ladder). Za vizuelizaciju, gel se boji rastvorom srebro-nitrata.

Po završenoj elektroforezi, gelovi se fiksiraju 20 minuta u rastvoru 10% etanola i 0,5% sirćetne kiseline. Bojenje gelova se vrši u 0,1% rastvoru srebro-nitrata u trajanju od 10 minuta. Potom se višak rastvora srebro-nitrata uklanja kratkim ispiranjem gela u destilovanoj vodi. Razvijanje boje se vrši 20 minuta pomoću razvijaa koji čine sledeće komponente: 1,5% natrijum-hidroksid, 0,01% natrijum-borhidrid i 0,048% formaldehid. Pre sipanja rastvarača, neophodno je gel isprati manjom količinom rastvarača, kako bi se uklonio višak rastvora srebra. Fiksiranje obojene DNK u gelu se vrši 10 minuta u rastvoru 0,75% natrijum-bikarbonata.

3.6 Statistička analiza

Statistička obrada podataka sprovedena je primenom SPSS 20.0 softvera, a vrednosti za verovatnoću $p < 0,05$ smatrane su statistički značajne. Kolmogorov-Smirnov test je bio korišćen za ispitivanje tipa raspodele kontinuiranih promenljivih. Studentov t-test, jednofaktorska i dvofaktorska analiza varijanse (one-way, two-way ANOVA) i post hoc analiza (Sidac test i Least Significant Difference test) bili su primenjeni za poređenje kontinuiranih promenljivih, dok su kategorički podaci upoređeni primenom χ^2 testa. Spearmanova korelaciona analiza korišćena je za utvrđivanje korelacije između pojedinih promenljivih. Za ispitivanje odstupanja distribucije genotipova i fenotipova od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže primenjen je χ^2 test i Fisher-ov egzaktni test kada je broj podataka bio manji od 5. U cilju određivanja pojedinačnih prediktora za pojavu HOBP, korišćen je binarni model logističke regresije.

4. Rezultati

U prvom delu istraživanja ispitane su razlike u koncentraciji AAT, funkcionalnoj aktivnosti AAT i nivou oksidacije AAT u patologiji HOBP. Drugi deo studije posvećen je analizi fenotipa AAT i njegovog značaja kao faktora u nastanku i progresiji HOBP. U trećem delu studije ispitan je uticaj MSRA rs10903323 polimorfizma na pojavu HOBP.

4.1. Ispitivanje uticaja faktora rizika na kvantitativne parametre AAT

4.1.1 Karakteristike kontrolne grupe i grupe pacijenata sa HOBP: deskriptivna analiza; analiza razlika kvantitativnih parametra AAT i spirometrijskih parametara

U Tabeli 10. prikazane su kvalitativne i kvantitativne karakteristike u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP. Primenom statističke analize Studentov t-test ispitivano je da li postoje razlike u parametrima između dve grupe.

Tabela 10. Kvalitativne i kvantitativne karakteristike kod zdravih ispitanika i pacijenata sa HOBP, kao i podeljenih u grupe prema polu

Karakteristika/ Parametar	Svi		Muškarci		Žene	
	Kontrola (n=134)	HOBP (n=155)	Kontrola (n=128)	HOBP (n=87)	Kontrola (n=6)	HOBP (n=68)
Starost, godine	43,50±11,02 ^a	64,51±8,29	43,35±11,02	64,85±8,41	46,67±11,47	64,06±8,16
BMI (kg/m ²)	26,93±3,93 [*]	24,60±5,51	26,98±3,85	25,0±5,44	25,7±5,75	24,0±5,69
Pušački status, pušači (%)	38,8	47,4	40,0	45,6 [*]	17,0	50,0
AAT (g/L)	1,70±0,30 ^a	2,13±0,51	1,70±0,29 ^c	2,16±0,550	1,88±0,56	2,08±0,47
SIA-elastaza (kU/g)	0,33±0,06 ^a	0,27±0,09	0,33±0,06 ^c	0,27±0,10	0,31±0,08	0,26±0,06
SIA-tripsin (kU/g)	1,51±0,26 ^a	1,21±0,39	1,51±0,26 ^c	1,21±0,46	1,42±0,44	1,20±0,30
Oksidovani AAT (%)	17,58±6,06 ^a	19,61±8,59	17,58±6,10	19,86±8,33	17,36±7,39	19,31±8,94
Oksidovani AAT (g/L)	0,31±0,12 ^a	0,41±0,19	0,31±0,12 ^c	0,41±0,18	0,31±0,11	0,40±0,20
Antielastazna aktivnost, %	79,28±4,90	78,77±7,86	79,27±4,94	79,57±7,34	79,56±2,95	77,85±8,40
Antitripsinska aktivnost, %	73,73±4,79 ^a	70,14±11,66	73,72±4,84 ^c	70,63±12,71	73,95±1,63	69,54±10,13
FEV1, %	-	37,22±18,11	-	55,69±20,02	-	58,50±25,78
FVC, %	-	56,94±22,71	-	36,42±18,74	-	38,21±17,39
Indeks FEV1/FVC	-	51,09±13,27	-	49,16±13,11 ^b	-	53,50±13,18

Kontinuirane promenjive 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); ^a razlika između kontrolne grupe i HOBP pacijenata; ^b HOBP: razlika prema polu; ^c muškarci: razlika između kontrolne grupe i HOBP pacijenata; statistička značajnost p<0,05.

U ovoj studiji pacijenti su bili stariji od zdravih ispitanika. Vrednosti indeksa telesne mase su bili značajno niži kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,007$). Koncentracija AAT i vrednosti oksidovanog AAT (% , g) su bile značajno više kod pacijenata sa HOBP u odnosu na kontrolnu grupu (redom $p<0,001$; $p=0,034$; $p<0,001$). Značajno niže vrednosti kod pacijenata sa HOBP u odnosu na kontrolne ispitanike dobijene su za SIA-elastazu ($p<0,001$), SIA-tripsin ($p<0,001$) i antitripsinsku aktivnost ($p<0,001$).

Analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u vrednostima parametara funkcionalne aktivnosti AAT kod pacijenata podeljenih prema polu, dok je vrednost indeksa FEV1/FVC bila niža kod ispitanika muškog pola u odnosu na ženski pol sa graničnom značajnošću ($p=0,065$). U grupi zdravih ispitanika, nisu ispitivane razlike u odnosu na pol, obzirom da je broj ispitanika ženskog pola bio mali ($n=6$).

Ako uporedimo ispitanike muškog pola, pacijenti su bili stariji od zdravih ispitanika. Pacijenti muškog pola su imali značajno više vrednosti koncentracije AAT ($p<0,001$), oksidovanog AAT (g/L) ($p<0,001$) i oksidovanog AAT (%) sa graničnom značajnosti ($p=0,053$) u odnosu na zdrave muškarce. S druge strane, pacijenti muškog pola su imali značajno niže vrednosti SIA-elastaze ($p<0,001$), SIA-tripsina ($p<0,001$) i antitripsinske aktivnosti ($p=0,036$) u odnosu na zdrave ispitanike muškog pola.

4.1.2 Korelacija između parametara funkcionalne aktivnosti AAT i oksidovanog AAT

Statistički značajne korelacije između parametara funkcionalne aktivnosti alfa-1-antitripsina i oksidovanog alfa-1-antitripsina ispitivane su primenom Pearsonove korelacije u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP (Tabela 11.). Kod obe grupe ispitanika uočena je značajna i veoma visoka pozitivna korelacija između SIA-elastaze i SIA-tripsina ($p<0,001$, $r>0,9$), kao i između oksidovanog AAT (%) i oksidovanog AAT (g/L). Antielastazna i antitripsinska aktivnost su bile u pozitivnoj korelaciji u obe ispitivane grupe. Očekivano, statistički značajna negativna korelacija je utvrđena između SIA-elastaze i oksidovanog AAT (g/L) u kontrolnoj grupi i kod pacijenata. U kontrolnoj grupi je dobijena značajna pozitivna korelacija između SIA-elastaze i antielastazne aktivnosti, kao i značajna negativna korelacija između SIA-elastaze i oksidovanog AAT (%), i SIA-tripsina i oksidovanog AAT (g/L). Kod ispitanika sa HOBP dobijena je značajna pozitivna korelacija između SIA-tripsina i antitripsinske aktivnosti.

Tabela 11. Korelacije između kvantitativnih parametara u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata

Parametar	Kontrola (n=128)	HOBP-pacijenti (n=123)
	r (p)	r (p)
SIA-elastaza (kU/g) i SIA-tripsin (kU/g)	0,918 (<0,001)	0,939 (<0,001)
SIA-elastaza (kU/g) i oksidovani AAT (%)	-0,408 (<0,001)	-0,094 (0,302)
SIA-elastaza (kU/g) i oksidovani AAT (g/L)	-0,687 (<0,001)	-0,426 (<0,001)
SIA-elastaza (kU/g) i antielastazna aktivnost	0,490 (<0,001)	0,087 (0,342)
SIA-tripsin (kU/g) i oksidovani AAT (%)	-0,018 (0,846)	0,242 (0,007)
SIA-tripsin (kU/g) i oksidovani AAT (g/L)	-0,377 (<0,001)	-0,150 (0,100)
SIA-tripsin (kU/g) i antitripsinska aktivnost	0,117 (0,194)	0,337 (<0,001)

Oksidovani AAT (%) i oksidovani AAT (g/L)	0,903 (<0,001)	0,863 (<0,001)
Antielastazna aktivnost i antitripsinska aktivnost	0,761 (<0,001)	0,675 (<0,001)

Rezultati su prikazani kao: Pearsonov koeficijent r (statistička značajnost p). HOBP-hronična opstruktivna bolest pluća; AAT-alfa-1-antitripsin; SIA-elastaza-specifična inhibitorna aktivnost AAT prema elastazi; SIA-tripsin-specifična inhibitorna aktivnost AAT prema tripsinu; p- statistička značajnost (p<0,05);

4.1.3 Analiza uticaja pušačkog statusa (pušači i nepušači) na funkcionalnu aktivnost AAT i oksidovani oblik AAT u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa HOBP

Da bi se ispitala razlika između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa HOBP, podeljenih na pušače i nepušače, za parametre koji pokazuju funkcionalnost AAT (SIA-tripsin, SIA-elastaza, antielastazna i antitripsinska aktivnost) i oksidovani AAT (% i g/L) primenjen je jednofaktorski ANOVA test i LSD post hoc test (Tabela 12., Slika 10.).

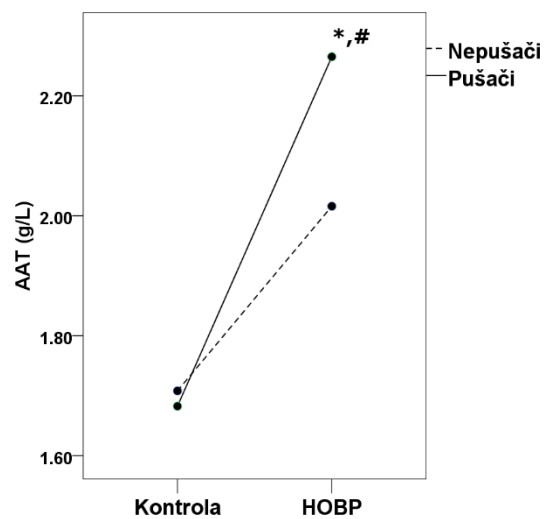
Tabela 12. Parametri funkcionalne aktivnosti AAT i nivo oksidovanog AAT u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata podeljenih prema pušačkom statusu na nepušače i pušače

Parametri	Kontrola (n=122)*		HOBP (n=132)*	
	Nepušači (n=75)	Pušači (n=47)	Nepušači (n=71)	Pušači (n=61)
AAT (g/L)	1,71±0,30 ^c	1,68±0,30 ^d	2,02±0,52 ^b	2,65±0,49
SIA-elastaza (kU/g)	0,33±0,06 ^c	0,34±0,07 ^d	0,28±0,11 ^b	0,25±0,06
SIA-tripsin (kU/g)	1,52±0,24 ^c	1,52±0,28 ^d	1,29±0,46 ^b	1,13±0,34
Oksidovani AAT (%)	18,51±5,31 ^a	15,73±6,81 ^d	20,34±8,45	21,53±7,81
Okisovani AAT (g/L)	0,32±0,11 ^c	0,27±0,13 ^d	0,41±0,18 ^b	0,47±0,18
Antielastazna aktivnost	79,00±4,17	79,90±5,90	78,87±8,20	80,18±8,24
Antitripsinska aktivnost	74,08±3,57 ^c	73,19±6,21	70,14±10,36	70,98±14,21

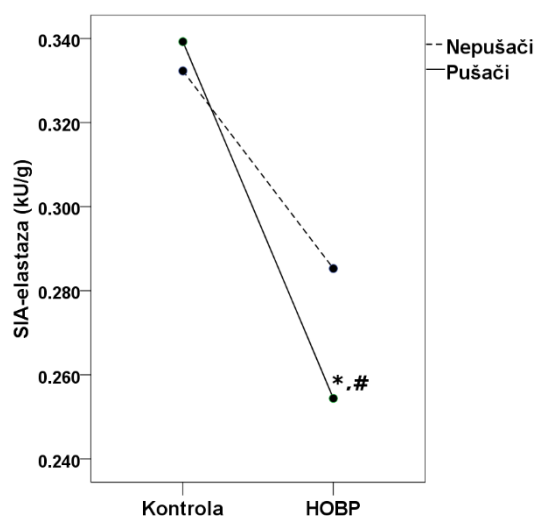
Kontinuirane promenjive su prikazane kao srednja vrednost±standardna devijacija. ^a razlika između nepušača i pušača u kontrolnoj grupi; ^b HOBP: razlika između nepušača i pušača u grupi HOBP-pacijenata, ^c nepušači: razlika između kontrole grupe i HOBP-pacijenata ; ^d pušači: razlika između kontrole grupe i HOBP-pacijenata.

*analizom su obuhvaćeni zdravi i HOBP-pacijenti za koje su potrebni podaci bili dostupni

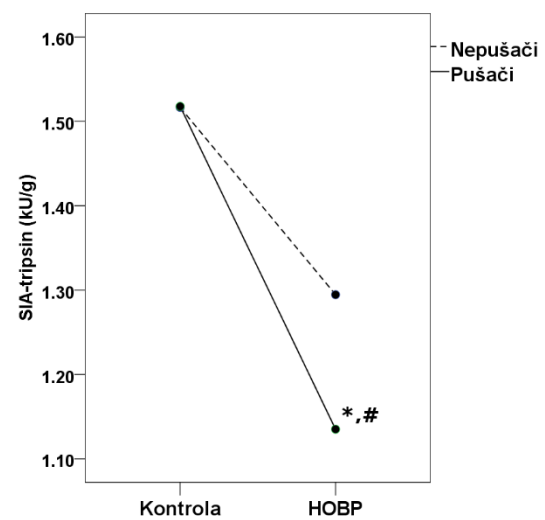
a.



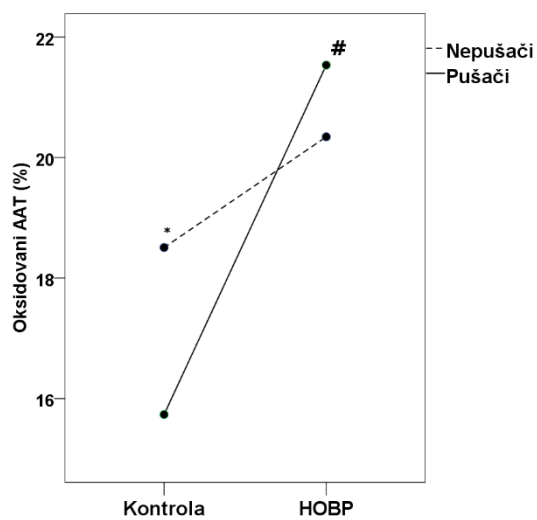
b.



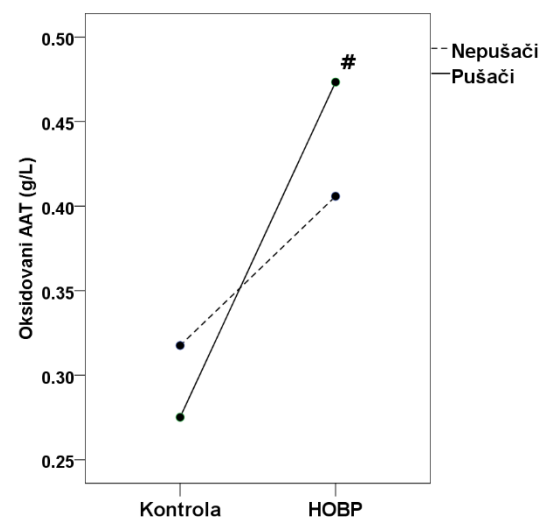
c.



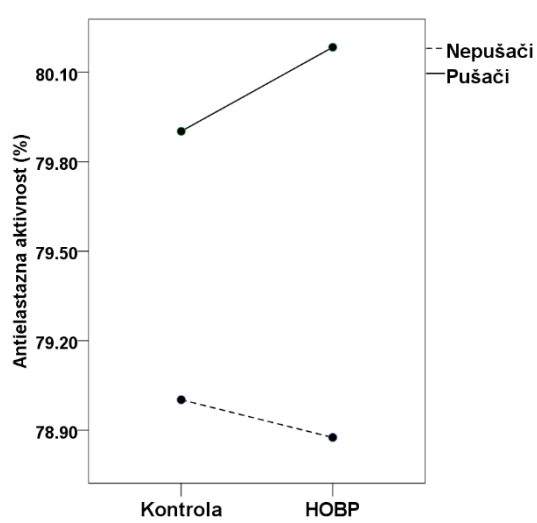
d.

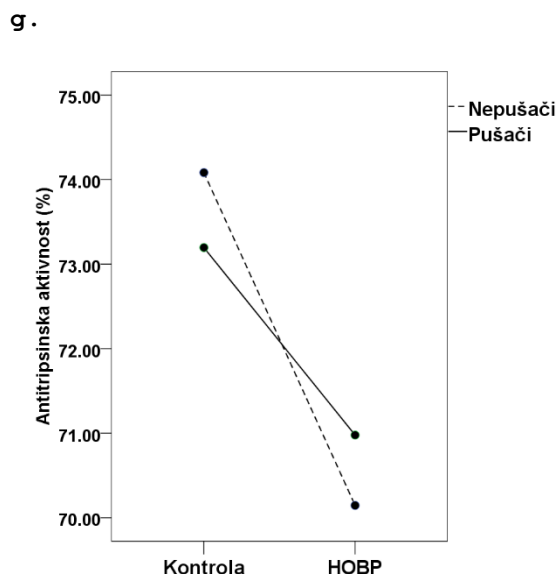


e.



f.





Slika 10. Uticaj pušačkog statusa na zavisne promenljive u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata: a. AAT (g/L); b. SIA-elastaza (kU/g); c SIA-tripsin (kU/g); d. Oksidovani AAT (%); e. Oksidovani AAT (g/L); f. Anti-elastazna aktivnost (%); g. Antitripsinska aktivnost (%). * u odnosu na nepušače; ≠ u odnosu na kontrolu.

Statistička analiza je pokazala da su vrednosti za SIA-elastazu i SIA-tripsin značajno niže kod pacijenata pušača nego pacijenata nepušača ($p=0,045$, $p=0,009$), dok je vrednost ukupnog AAT i oksidovanog AAT (g/L) značajno viša kod pacijenata koji su pušači u odnosu na nepušače ($p=0,001$; $p=0,026$).

U grupi pušača, značajno niže vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina imali su HOBP-pacijenti u odnosu na kontrolnu grupu (za SIA-elastazu $p<0,001$; za SIA-tripsin $p<0,001$). Takođe u grupi pušača, dobijen je značajno viši nivo ukupnog AAT i oksidovanog AAT (% , g/L) kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (za AAT $p<0,001$; za oksidovani AAT (%) $p<0,001$).

U kontrolnoj grupi, dobijen je značajno viši nivo oksidovanog AAT (%) kod nepušača nego pušača ($p=0,038$), dok u grupi HOBP-pacijenta nije utvrđena značajna razlika između pušača i nepušača za nivo oksidovanog AAT (%).

4.1.4 Analiza uticaja pušenja (pušači, bivši pušači i nepušači) na parametre funkcionalne aktivnosti AAT i oksidovani oblik AAT kod zdravih ispitanika i pacijenata sa HOBP

Za ispitivanje razlike u parametrima funkcionalne aktivnosti AAT i nivou oksidovanog AAT kod zdravih i kod pacijenata sa HOBP koji su podeljeni prema pušačkom statusu na pušače, nepušače i bivše pušače korišćeni su ANOVA i LSD post hoc test (Tabela 13.).

Tabela 13. Razlike u parametrima funkcionalne aktivnosti AAT i nivou oksidovanog AAT u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata podeljenih prema pušačkom statusu na nepušače, bivše pušače i pušače

Biomarkeri	Kontrola (n=122)*			HOBP-pacijenti (n=132)*		
	Nepušači (n=57)	Bivši pušači (n=18)	Pušači (n=47)	Nepušači (n=12)	Bivši pušači (n=59)	Pušači (n=61)
AAT (g/L)	1,67±0,29 ^a	1,82±0,30	1,68±0,29	1,96±0,53	2,02±0,52	2,27±0,49
SIA-elastaza (kU/g)	0,34±0,06	0,31±0,05	0,33±0,06 ^b	0,29±0,06	0,28±0,11	0,25±0,06
SIA-tripsin (kU/g)	1,54±0,25 ^a	1,43±0,22	1,52±0,28	1,25±0,42	1,30±0,47 ^d	1,13±0,34
Oksidovani AAT (%)	18,78±5,33	17,64±5,32	15,74±5,32	19,59±10,67	20,49±8,09	21,53±7,81
Oksidovani AAT (g/L)	0,32±0,11	0,32±0,11 ^c	0,27±0,13	0,40±0,27	0,40±0,16 ^d	0,47±0,18
Antielastazna aktivnost	79,10±4,29	78,79±3,92	79,90±5,90	81,49±7,96	78,31±8,23	80,18±8,24
Antitripsinska aktivnost	73,76±3,72 ^a	75,09±2,94	73,20±6,21	65,87±17,73	71,53±8,09	70,98±14,18

^a nepušači: kontrolna grupa u odnosu na HOBP; ^b pušači: kontrolna grupa u odnosu na HOBP; ^c bivši pušači: kontrolna grupa u odnosu na HOBP; ^d pacijenti; pušači u odnosu na bivše pušače; p<0,05;

*analizom su obuhvaćeni zdravi i HOBP-pacijenti za koje su potrebni podaci bili dostupni

Vrednost serumskog nivoa AAT bila je značajno viša kod pacijenta nepušača u odnosu na nepušače u kontrolnoj grupi (p=0,037). Dalja analiza je pokazala, u grupi nepušača, značajno niže vrednosti SIA-tripsina i antitripsinske aktivnosti kod pacijenata u odnosu na zdrave (redom p=0,011; p=0,009). Kod pušača, SIA-elastaza je bila značajno niža kod pacijenata u odnosu na zdrave (p<0,001). U grupi bivših pušača oksidovani AAT (g/L) bio je značajno viši kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (p=0,039).

U grupi pacijenata pušači imaju značajno višu vrednost oksidovanog AAT (g/L) u odnosu na bivše pušače (p=0,035), dok je vrednost SIA-tripsina značajno niža (p=0,009). Vrednost za SIA-elastazu bila je niža kod pacijenata bivših pušača u odnosu na trenutne pušače, sa graničnom značajnosti (p=0,059).

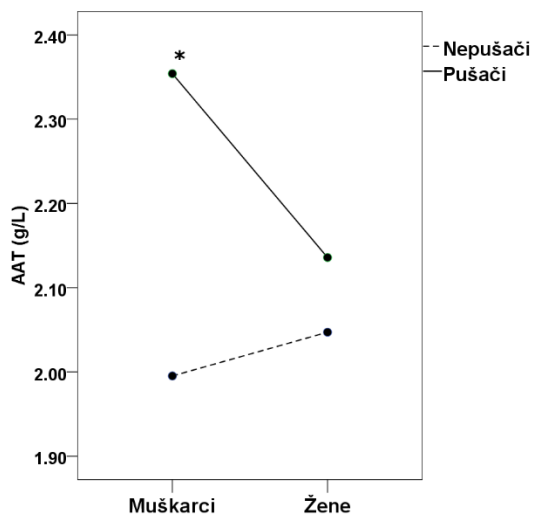
4.1.5 Analiza udruženog uticaja pola i pušačkog statusa na parametre funkcionalne aktivnosti AAT, nivo oksidovanog AAT i parametre funkcionalne aktivnosti pluća kod HOBP-pacijenata

Radi ispitivanja udruženog uticaja pušenja (pušač/nepušač) i pola na vrednosti SIA-elastaze, SIA-tripsina, antielastazne aktivnosti, antitripsinske aktivnosti i parametara plućne funkcije (FVC, FEV1, FEV1/FVC) korišćena je dvofaktorska univarijantna analiza varijanse (dvofaktorska ANOVA) (Tabela 14., Slika 11.).

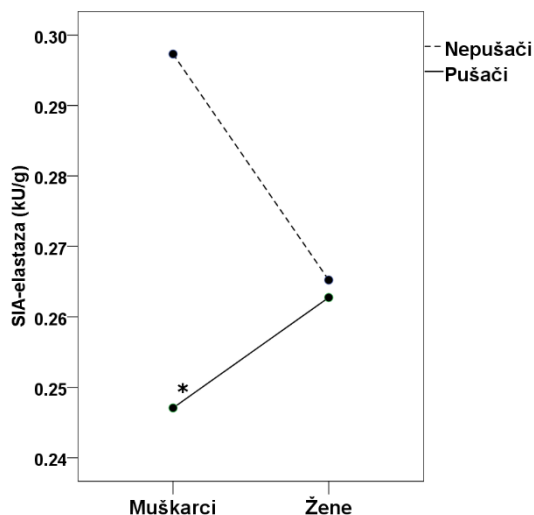
Tabela 14. Uticaj pola (ženski/muški) i pušačkog statusa (pušač/nepušač) na parametre funkcionalne aktivnosti AAT, nivo oksidovanog AAT i parametre plućne funkcije kod HOBP-pacijenata

Biomarkeri	Udruženi uticaj faktora i njihove interakcije	p
AAT (g/L)	Pol*Pušački status	0,141
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Pušenje:muškarci	0,020
SIA-elastaza (kU/g)	Udruženi uticaj faktora i njihove interakcije	
	Pol*Pušački status	0,198
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Pušenje:muškarci	0,039
SIA-tripsin (kU/g)	Udruženi uticaj faktora i njihove interakcije	
	Pol*Pušački status	0,010
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Pušenje:muškarci	0,001
Antielastazna aktivnost	Udruženi uticaj faktora i njihove interakcije	
	Pol*Pušački status	0,299
Antitripsinska aktivnost	Pol*Pušački status	0,132
Oksidovani AAT (%)	Pol*Pušački status	0,473
Oksidovani AAT (g/L)	Pol*Pušački status	0,960
FVC (%)	Pol*Pušački status	0,091
FEV1(%)	Pušenje (pušač/nepušač)* Pol (ženski/muški)	0,914
FEV1/FVC(%)	Udruženi uticaj faktora i njihove interakcije	
	Pol*Pušački status	0,016
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Pol: nepušači	0,005

a.

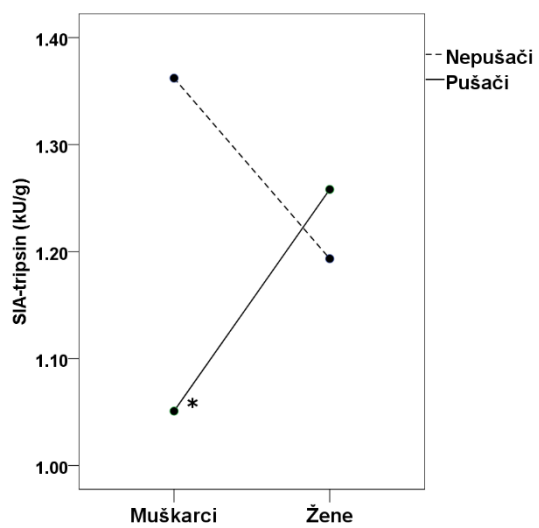


b.

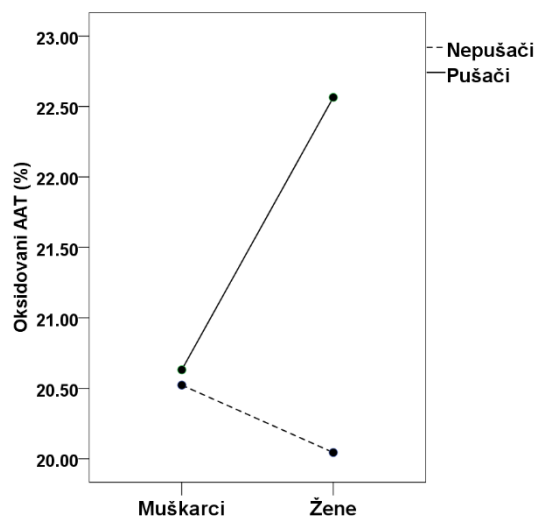


Nastavak Slike 11.

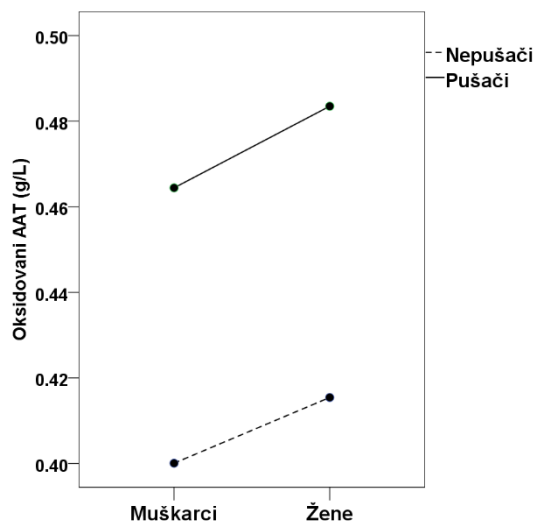
c.



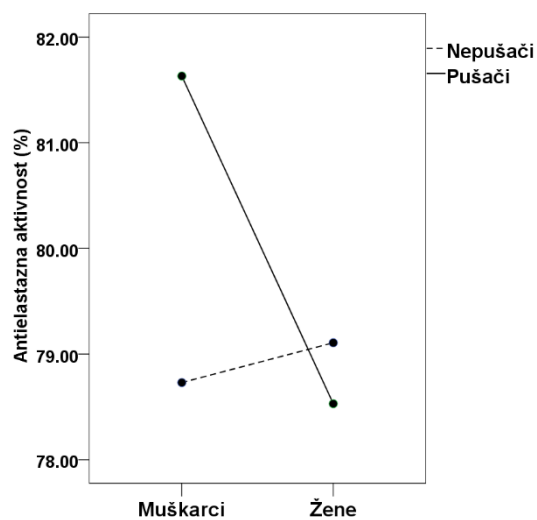
d.



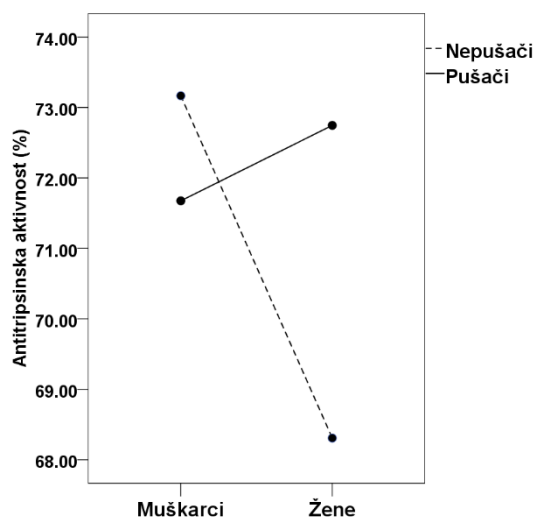
e.



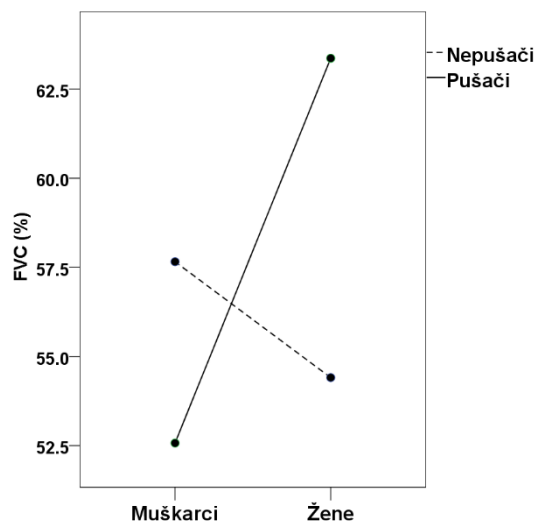
f.



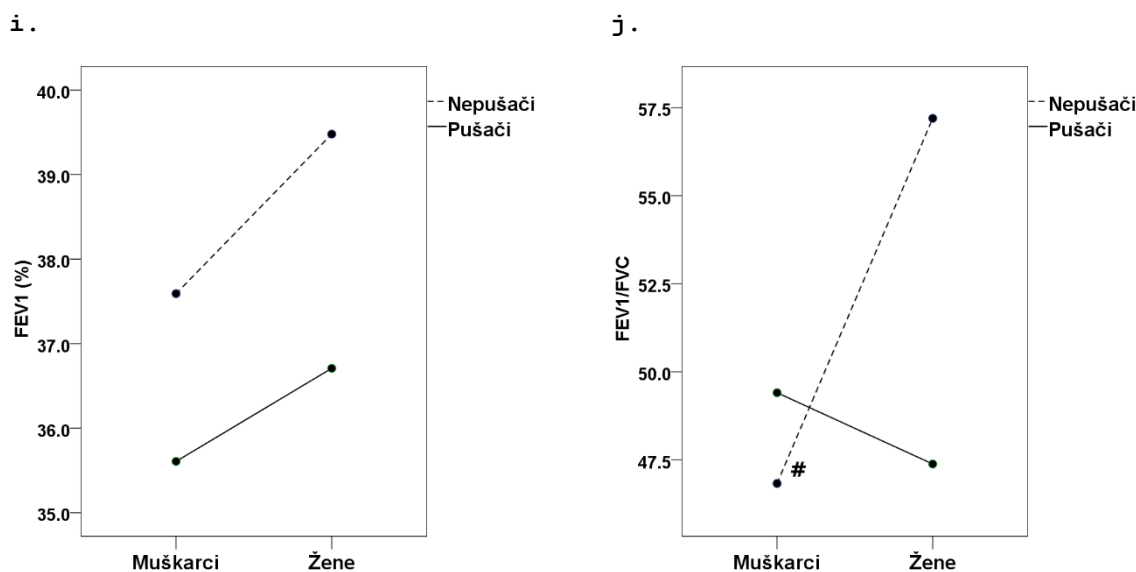
g.



h.



Nastavak Slike 11.



Slika 11. Udruženi uticaj pušačkog statusa i pola na parametre funkcionalne aktivnosti AAT, nivo oksidovanog AAT i parametre funkcionalne aktivnosti pluća kod HOBP-pacijenata: a. AAT (g/L) b. SIA-elastazu (kU/g); c. SIA-tripsin (kU/g); d. Oksidovani AAT (%); e. Oksidovani AAT (g/L); f. Antielastazna aktivnost; g. Antitripsinska aktivnost; h. FVC (%); i. FEV1 (%); j. FEV1/FVC. * u odnosu na nepušače; # u odnosu na žene.

Statistička analiza je pokazala da postoji značajan uticaj interakcije pušačkog statusa i pola na vrednost SIA-tripsina ($p=0,010$) i na indeks FEV1/FVC ($p=0,016$) kod pacijenata sa HOBP. Primenom post hoc testa po Šidaku dokazano je da su HOBP pacijenti-muškarci pušači imali značajno više vrednosti koncentracije AAT ($p=0,02$), kao i niže vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina u odnosu na HOBP pacijente-muškarce nepušače ($p=0,039$; $p=0,001$, redom). U grupi HOBP-pušača, muškarci su imali nižu vrednost SIA-tripsina u odnosu na žene, sa graničnom značajnošću ($p=0,053$). U grupi HOBP-nepušača, muškarci su imali značajno nižu vrednost indeksa FEV1/FVC u odnosu na žene ($p=0,005$).

4.1.6 Funkcionalna aktivnost AAT, oksidovani AAT i parametri plućne funkcije kod pacijenata sa HOBP podeljenih prema težini bolesti

Da bi se utvrdila razlika u vrednostima koncentracije AAT, parametara funkcionalne aktivnosti AAT, nivoa oksidovanog AAT i parametara plućne funkcije u grupi pacijenata koju su činili ispitanici za koje su postojali podaci o težini bolesti sprovedena je statistička analiza. HOBP-pacijenti su podeljeni u dve grupe, sa umerenim oblikom (GOLD 2) i grupu koja obuhvata pacijente sa teškim i veoma teškim oblikom bolesti (GOLD 3+4) (Tabela 15.). Ispitivanje nije pokazalo statistički značajne razlike za vrednosti koncentracije AAT, kao ni za parametre funkcionalne aktivnosti i nivoa oksidovanog AAT zavisno od težine HOBP. Očekivano, parametri plućne funkcije FVC i FEV1 bili su značajno niži kod pacijenata sa teškim i veoma teškim oblikom bolesti (GOLD 3+4) nego kod pacijenata sa umerenim oblikom bolesti (GOLD 2) ($p<0,001$, $p<0,001$, redom), kao i indeks FEV1/FVC ($p=0,015$) (Tabela 15.).

Tabela 15. Ispitivanje razlika u vrednostima koncentracije AAT, funkcionalne aktivnosti AAT, nivoa oksidovanog AAT i parametara plućne funkcije prema težini HOBP (lakši oblik: GOLD 2; teški oblik; GOLD 3+4)

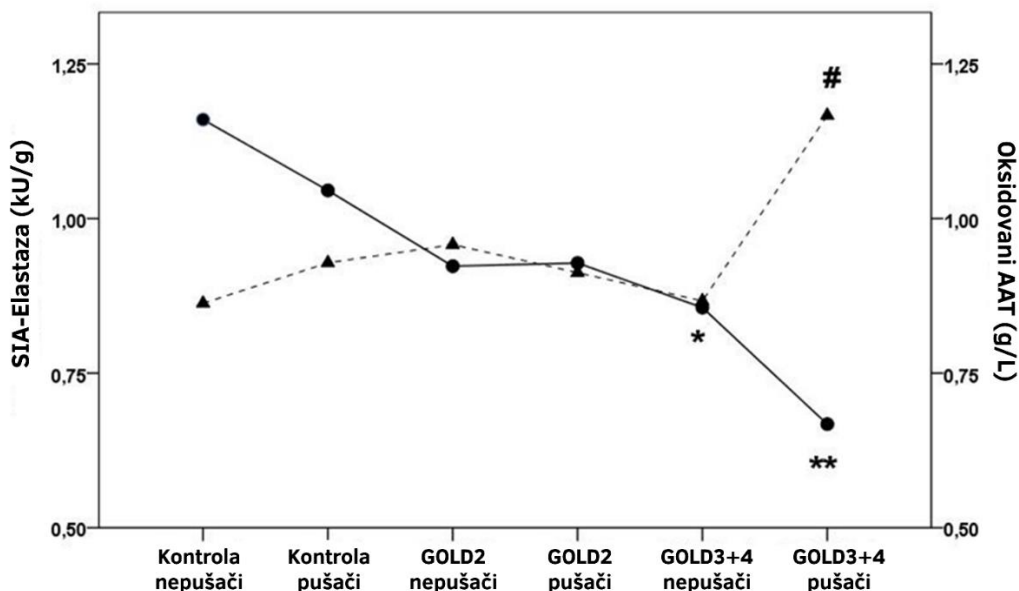
Biomarkeri	GOLD 2 (n=21)**	GOLD 3+4 (n=71)**	P*
AAT (g/L)	2,10±0,49	2,15±0,56	0,756
SIA-elastaza (kU/g)	0.30±0,10	0,28±0,10	0,106
SIA-tripsin (kU/g)	1,27±0,49	1,23±0,44	0,399
Oksidovani AAT (%)	20,97±5,63	18,76±8,51	0,541
Oksidovani AAT (g/L)	0.43±0,15	0,39±0,17	0,617
Antielastazna aktivnost	83,82±6,89	80,17±8,80	0,478
Antitripsinska aktivnost	71,47±17,22	70,80±11,08	0,932
FVC,%	89,28±19,92*	50,19±18,35	< 0,001
FEV1,%	65.10±15,08*	29,31±11,31	< 0,001
FEV1/FVC indeks	54,59±10,04*	46,71±13,73	0,001

* razlika između HOBP pacijenata podeljenih prema težini bolesti na dve grupe (GOLD2 vs. GOLD3+4)

** analizom su obuhvaćeni zdravi i HOBP-pacijenti za koje su potrebni podaci bili dostupni

4.1.7 Analiza uticaja pušenja (pušač, nepušač) na nivo oksidovanog AAT i SIA-elastaze kod kontrolne grupe i pacijenata podeljenih prema težini HOBP (GOLD2, GOLD3+4)

Primenom testa dvofaktorske analize varijanse ispitivan je uticaj pušačkog statusa u kontrolnoj grupi i kod HOBP pacijenata na nivoe oksidovanog AAT (g/L) i SIA-elastazu, kao i kod HOBP pacijenata podeljenih prema težini bolesti (GOLD2 i GOLD3+4) (Slika 12.).

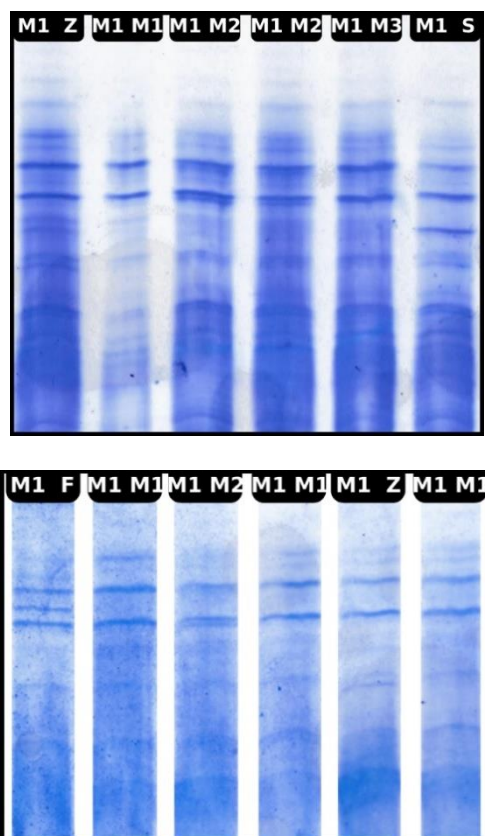


Slika 12. Srednje vrednosti SIA-elastaze i oksidovanog AAT (%) kod pacijenata i kontrola, kao i kod pacijenata podeljenih prema težini bolesti (GOLD2, GOLD3+4). • srednja vrednost za SIA-elastazu; ▲ srednja vrednost za oksidovani AAT (g/L); * razlika SIA-elastaze u odnosu na zdrave nepušače; ** razlika SIA-elastaze u odnosu na zdrave nepušače i pušače; # razlika oksidovanog AAT u odnosu na zdrave pušače i nepušače, pušače sa GOLD2 i nepušače sa GOLD3+4

Rezultati su pokazali da su pacijenti nepušači koji su bili u grupi GOLD3+4 imali značajno nižu vrednost SIA-elastaze u odnosu na zdrave nepušače ($p=0,037$). Takođe, najniže vrednosti SIA-elastaze dobijene su kod pacijenata sa teškim i veoma teškim oblikom bolesti, a to je bilo značajno niže nego kod zdravih pušača i nepušača ($p=0,034$, $p=0,001$, redom). Nasuprot tome, HOBP-pušači sa GOLD3+4 stadijumom bolesti imali su najviši nivo oksidovanog AAT (%) u poređenju sa svim drugim ispitivanim grupama (u odnosu na zdrave nepušače $p=0,009$, u odnosu na zdrave pušače $p=0,033$, u odnosu na GOLD2 pušače $p=0,22$ i u odnosu na GOLD3+4 nepušače $p=0,038$).

4.2 Analiza fenotipova alfa-1-antitripsina

Na Slici 13. prikazan je gel na kome se uočavaju frakcije fenotipova AAT, dobijene metodom izoelektrofokusinga.



Slika 13. Identifikacija fenotipa AAT nakon izoelektrofokusinga pri gradijentu pH 4,2-4,9

4.2.1 Analiza raspodele alela i fenotipova alfa-1-antitripsina u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata

Analiza distribucije fenotipova alfa-1-antitripsina određena je u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP upotrebom χ^2 testa. Poređenjem učestalosti analiziranih pojedinačnih alela i fenotipova nije utvrđena značajna razlika između kontrole i pacijenata ($p>0,05$) (Tabela 16.). Frekvence analiziranih fenotipova i alela u kontrolnoj grupi nisu bile u Hardy-Weinbergovoj (H-W) ravnoteži (0,0014), kao ni u grupi pacijenata ($p<0,001$) (Tabela 16.). Odstupanje od H-W ravnoteže u kontrolnoj grupi posledica je razlike između očekivane i dobijene frekvence za M3 fenotip, koja je bila blizu granice značajnosti ($p=0,057$). U grupi pacijenata, odstupanje od H-W ravnoteže je dobijeno usled statistički značajne razlike između očekivane i dobijene učestalosti za M2Z fenotip ($p=0,042$).

Tabela 16. Distribucija AAT fenotipova i alela (n, %) u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata

Fenotip AAT	Kontrola (n=126)			HOBP-pacijenti (n=154)			p**
	DB (%)	OB (%)	p*	DB (%)	OB (%)	p*	
M1	62 (49,2)	57,3(45,5)	0,538	78 (50,6)	70,9 (46,1)	0,399	0,806
M2	8 (6,3)	5,6 (4,4)	0,304	9 (5,8)	5,5 (3,5)	0,130	0,862
M3	3 (2,4)	1 (0,8)	0,057	2 (1,3)	0,8 (0,5)	0,171	0,496
M1M2	30 (23,8)	35,7 (28,4)	0,336	29 (18,8)	39,4 (25,6)	0,098	0,310
M1M3	10 (7,9)	15,5 (12,3)	0,164	12 (7,8)	14,9 (9,7)	0,448	1,0
M2M3	7 (5,6)	4,8 (3,8)	0,325	6 (3,9)	4,1 (2,6)	0,361	0,512
M1Z	3 (2,3)	2,7 (2,1)	0,854	5 (3,2)	7,5 (4,8)	0,367	0,665
M2Z	1 (0,7)	0,8 (0,7)	0,863	5 (3,2)	2,1 (1,3)	0,042	0,158
M3Z	0	0,4 (0,03)	0,375	0	0,8 (0,05)	0,375	
M1S	2 (1,6)	1,3 (1,0)	0,575	5 (3,2)	4,1 (2,6)	0,645	0,376
M1F	-	-	-	2 (1,3)	1,4 (0,08)	0,581	
SZ	-	-	-	1 (0,6)	0,2 (0,1)	0,089	
Alel							
M1	170 (67,5)			209 (67,9)			0,920
M2	53 (21,0)			58 (18,8)			0,516
M3	23 (9,1)			22 (7,1)			0,390
Z	4 (1,6)			11 (3,6)			0,148
S	2 (0,8)			6 (1,9)			0,252
F	0			2 (0,6)			0,111
H-W χ^2 (p) 10,26 (0,0014)				H-W χ^2 (p) 20,42 (p<0,001)			

Rezultati učestalosti fenotipova i alela u tabeli su prikazani kao broj (%); p*: razlika između dobijene i očekivane vrednosti (testiranje Hardy-Weinbergove ravnoteže); p**: razlika između HOBP-pacijenata i kontrolne grupe; DB: dobijen broj; OB: očekivan broj; statistička značajnos p<0,05

*analizom su obuhvaćeni zdravi i HOBP-pacijenti za koje su potrebni podaci bili dostupni

4.2.2 Analiza razlike u distribuciji nedeficijentnih i deficijentnih fenotipova AAT između kontrolne grupe i HOBP-pacijenata

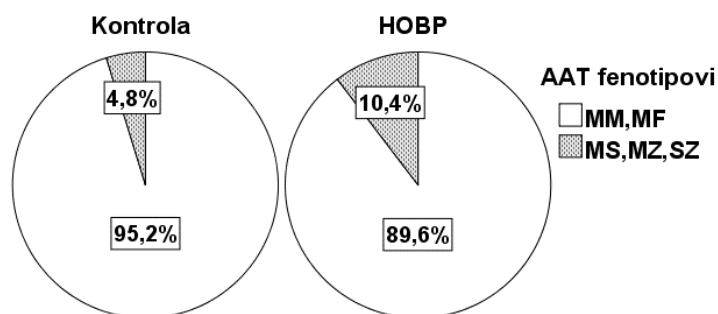
Primenom Fisher exact testa za analizu 2x2 tabele kontingencije upoređena je distribucija nedeficijentnih (MM, MF) i deficijentnih (MS, MZ, SZ) fenotipova alfa-1-antitripsina između kontrolne grupe i grupe HOBP-pacijenata. . Primenom Fisher exact testa dobijena je veća učestalost deficijentnih fenotipova AAT u grupi HOBP pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (p=0,041), zbog malog broja deficijentnih fenotipova u kontrolnoj grupi (n=6, što je na granici za primenu ovog testa). Međutim, primenom Pearsonovog χ^2 testa dobijena je razlika u distribuciji normalnih i deficijentnih fenotipova kod zdravih i pacijenata sa HOBP, sa graničnom značajnosti (p=0,084) (Tabela 17., Slika 14.).

Tabela 17. Razlika u distribuciji nedeficijentnih i deficijentnih fenotipova AAT (n, %) između kontrolne grupe i grupe HOBP-pacijenata

Fenotip AAT	Kontrola (n=125)	HOBP-pacijenti (n=154)	p*	p**	OR (95% CI)
Nedeficijentni (MM, MF)	119 (95,20)	138 (90,26)	0,041	0,084	2,3 (0,872-6,065)
Deficijentni (MS, MZ, SZ)	6 (4,80)	16 (10,39)			

*Fisher exact test-razlika između kontrola i pacijenata

**Verovatnoća za Pearson's χ^2 -razlika između kontrola i pacijenata



Slika 14. Distribucija nedeficijentnih i deficijentnih fenotipova AAT u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata

4.2.3 Analiza razlike u distribuciji normalnih (MM) i mutiranih (MF, MS, MZ, SZ) fenotipova AAT između kontrolne grupe i HOBP-pacijenata

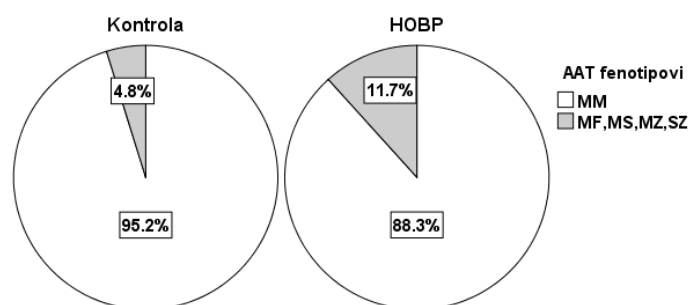
Primenom Fisher exact testa za analizu 2x2 tabele kontigencije upoređena je distribucija normalnih (MM) i mutiranih (MF, MS, MZ, SZ) fenotipova alfa-1-antitripsina između kontrolne grupe i grupe HOBP-pacijenata. Dobijena je značajno veća učestalost mutiranih fenotipova AAT u grupi HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,021$). Takođe, primenom Pearsonovog χ^2 testa dobijena je značajna razlika u distribuciji normalnih i deficijentnih fenotipova kod zdravih i pacijenata sa HOBP ($p=0,041$) (Tabela 18., Slika 15.). Nosioi mutiranih AAT fenotipova su imali 2,6 veći rizik da obole od HOBP u odnosu na normalne MM fenotipove.

Tabela 18. Razlika u distribuciji normalnih i mutiranih fenotipova AAT (n, %) između kontrolne grupe i HOBP-pacijenta

Fenotip AAT	Kontrola (n=124)	HOBP-pacijenti (n=154)	p*	p**	OR (95% CI)
Normalni (MM)	119 (95,20)	136 (88,30)	0,021	0,041	2,625 (1,009-6,829)
Mutirani (MF, MS, MZ, SZ)	6 (4,80)	18 (11,70)			

*Fisher exact test-razlika između kontrola i pacijenata

**Verovatnoća za Pearson's χ^2 -razlika između kontrola i pacijenata



Slika 15. Distribucija normalnih i mutiranih fenotipova AAT u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata

4.2.4 Ispitivanje povezanosti između fenotipova AAT (nedeficijentni i deficijentni), koncentracije AAT, funkcionalne aktivnosti AAT i nivoa oksidovanog AAT u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata

Ispitivan je nivo serumskog AAT (g/L), parametri funkcionalne aktivnosti AAT (SIA-elastaza, SIA-tripsin, antielastazna i antitripsinska aktivnost), oksidovani AAT (% i g/L) kod ispitanika u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa HOBP u odnosu na fenotip alfa-1-antitripsina. Ispitanici su prema fenotipovima AAT klasifikovani u dve grupe: ispitanici nosioci nedeficijentnih alela (MM, MF) i ispitanici nosioci deficijentnih alela (MS, MZ, SZ) (Tabela 19.).

Tabela 19. Uticaj fenotipova AAT (deficijentni: MS, MZ, SZ i nedeficijentni: MM i MF) na koncentraciju AAT, antielastaznu aktivnost, antitripsinsku aktivnost i nivo oksidovanog AAT u kontrolnoj grupi i grupi HOBP-pacijenata

Biomarkeri	Kontrola		HOBP	
	MM,MF (n=120)	MS,MZ, SZ (n=6)	MM,MF (n=138)	MS,MZ, SZ (n=16)
AAT (g/L)	1,72±0,28 ^{a,c}	1,34±0,50	2,16±0,49 ^d	1,82±0,64
SIA-Elastaza	0,33±0,06 ^a	0,37±0,08	0,26±0,06	0,33±0,21
SIA-Tripsin	1,50±0,25 ^{a,c}	1,73±0,29	1,19±0,32	1,37±0,81 ^b
Antielastazna aktivnost	79,38±4,91	76,21±3,87	79,07±7,84	75,66±7,70
Antitripsinska aktivnost	74,16±4,0 ^a	64,93±8,86	71,14±11,15 ^d	62,34±12,86
Oksidovani AAT (%)	17,70±6,05 ^a	13,88±5,93	19,77±8,60	18,00±8,73
Oksidovani AAT (g/L)	0,31±0,12 ^a	0,23±0,18	0,41±0,18	0,34±0,22

^a Nedeficijentni fenotipovi: razlika između kontrole i pacijenata; ^b deficijentni fenotipovi: razlika između kontrole i pacijenata; ^c kontrola: razlika između nedeficijentnih i deficijentnih fenotipova; ^d HOBP-pacijenti: razlika između nedeficijentnih i deficijentnih fenotipova; vrednosti za kvantitativne promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±Sd.

Statistička analiza je pokazala da kod ispitanika koji su nosioci nedeficijentnih AAT fenotipova postoji statistički značajno povišena koncentracija AAT kod HOBP pacijenata u odnosu na zdrave osobe ($p < 0,001$).

Kod ispitanika sa nedeficijentnim AAT fenotipovima, vrednosti za SIA-elastazu, SIA-tripsin i

antitripsinsku aktivnost bile su značajno niže kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p = 0,004$, redom). Nivo oksidovanog AAT izražen u % i g/L bio je statistički značajno povišen kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu kod nosilaca nedeficijentnih AAT fenotipova ($p = 0,045$, $p < 0,001$, redom).

Primenom neparametarskog Mann-Whitney U-testa, u grupi ispitanika sa deficijentnim fenotipom AAT, dokazano je da je SIA-tripsin bio značajno niži kod pacijenata nego u kontrolnoj grupi ($p = 0,027$), kao i SIA-elastaza, ali sa verovatnoćom na granici značajnosti ($p = 0,055$). U istoj grupi, ispitanika sa deficijentnim fenotipom AAT vrednost koncentracije AAT bila je niža kod pacijenata u odnosu na zdrave, sa graničnom značajnosti ($p = 0,055$). Vrednosti oksidovanog AAT kod ispitanika sa deficijentnim AAT fenotipovima nisu se značajno razlikovale između kontrolne grupe i grupe pacijenata.

U kontrolnoj grupi ispitanici sa deficijentnim AAT fenotipovima imali su nižu antitripsinsku aktivnost u odnosu na nosioce nedeficijentnih fenotipova, sa graničnom značajnošću ($p = 0,051$). Pored toga, zdravi ispitanici nosioci deficijentnih fenotipova imali su značajno nižu koncentraciju AAT ($p = 0,002$). Takođe, nosioci nedeficijentnih fenotipova imali su značajno niže vrednosti SIA-tripsina u odnosu na deficijentne ($p = 0,040$).

U grupi HOBP-pacijenata dobijena je značajno niža koncentracija AAT ($p = 0,013$) i antitripsinska aktivnost ($p = 0,005$) kod nosilaca deficijentnih fenotipova u odnosu na nedeficijentne.

4.2.5 Ispitivanje povezanosti između fenotipova AAT (mutirani i normalni), koncentracije AAT, funkcionalne aktivnosti AAT i nivoa oksidovanog AAT kod HOBP-pacijenata

Kako je u grupi HOBP pacijenata detektovano prisustvo MF fenotipa, nakon podele fenotipova AAT na normalne (MM) i mutirane (MF, MS, MZ, SZ), ispitan je njihov uticaj na nivo serumskog AAT (g/L), parametre funkcionalne aktivnosti AAT (SIA-elastaza, SIA-tripsin, antielastazna i antitripsinska aktivnost) i na nivo oksidovanog AAT (% i g/L) kod ispitanika kod pacijenata sa HOBP (Tabela 20.).

Tabela 20. Uticaj fenotipova AAT (normalni: MM i mutirani: MF, MS, MZ, SZ) na koncentraciju AAT, antielastaznu aktivnost, antitripsinsku aktivnost i nivo oksidovanog AAT u grupi HOBP-pacijenata

Biomarkeri	Fenotipovi AAT MM (n=136)	Fenotipovi AAT MF,MS,MZ, SZ (n=18)
AAT (g/L)	2,16±0,49 ^a	1,86±0,63
SIA-Elastaza	0,26±0,06	0,32±0,20
SIA-Tripsin	1,19±0,32	1,34±0,77
Antielastazna aktivnost	79,22±7,84	74,98±7,25
Antitripsinska aktivnost	71,22±11,21 ^a	62,75±12,09
Oksidovani AAT (%)	19,94±8,58	16,88±8,51
Oksidovani AAT (g/L)	0,42±0,19	0,33±0,21

^aRazlika između normalnih i mutiranih fenotipova AAT; vrednosti za kvantitativne promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±Sd.

Koncentracija AAT bila je značajno niža kod nosilaca mutiranog fenotipa u odnosu na one sa

normalnim ($p=0,023$). Dalje, vrednost antitripsinske aktivnosti bila je značajno niža kod pacijenata sa mutiranim u odnosu na one sa normalnim fenotipom AAT ($p=0,004$).

Takođe, vrednost antielastazne aktivnosti bila je niža kod pacijenata sa mutiranim u odnosu na nosioce normalnog AAT fenotipa, sa graničnom značajnosti ($p=0,066$).

4.2.6 Analiza udruženog uticaja polimorfizma AAT, pušačkog statusa i prisustva/odsustva HOBP na funkcionalnu aktivnosti AAT i nivo oksidovanog AAT

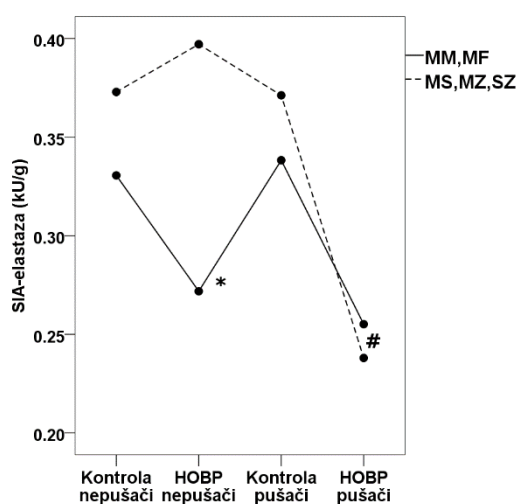
Sa ciljem da se ispita uticaj međusobnih interakcija prisustva/odsustva HOBP, fenotipova AAT (deficijentni: MS, MZ, SZ i nedeficijentni: MM i MF) i pušačkog statusa na vrednosti SIA-elastaze, SIA-tripsina, antielastazne i antitripsinske aktivnosti, kao i na nivo oksidovanog AAT (izraženog u % i g/L) korišćena je trofaktorska analiza varijanse (Tabela 21., Slika 16.)

Tabela 21. Udruženi uticaj fenotipova AAT (deficijentni: MS, MZ, SZ i nedeficijentni: MM, MF), stanja (prisustvo/odsustvo HOBP) i pušačkog statusa (pušači/nepušači) na funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT

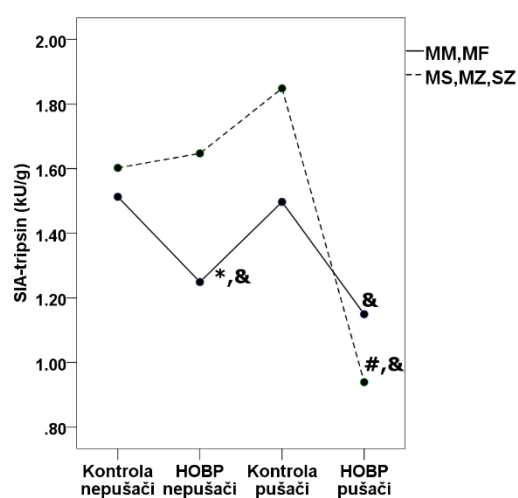
Zavisna promenljiva	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
SIA-elastaza	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,217
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	FenotipAAT(MM,MF/MS,MZ,SZ): pacijenti-nepušači	<0,001
	Pušenje(Pušač/Nepušač): MS,MZ, SZ -pacijenti	0,009
SIA-tripsin	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,015
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	FenotipAAT(MM,MF/MS,MZ,SZ): pacijenti-nepušači	0,002
	Pušenje(Pušač/Nepušač): MS,MZ, SZ -pacijenti	0,001
	Stanje(HOBP/Kontrola): MS,MZ, SZ -pušači	<0,001
	Stanje(HOBP/Kontrola): MM, MF-pušači	<0,001
	Stanje(HOBP/Kontrola): MM, MF-nepušači	<0,001
Antielastazna aktivnost	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,913
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Pušenje(Pušač/Nepušač): MS,MZ, SZ -kontrola	0,007
	Pušenje(Pušač/Nepušač): MS,MZ, SZ -HOBP	<0,001
Antitripsinska aktivnost	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,875
Oksidovani AAT (%)	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,398
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	FenotipAAT(MM,MF/MS,MZ,SZ): nepušač-HOBP	0,033

Oksidovani AAT (g/L)	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,198
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	FenotipAAT(MM,MF/MS,MZ,SZ): nepušač-HOBP	0,010
	Pušenje(Pušač/Nepušač): MS,MZ, SZ -HOBP	0,014
	Stanje(HOBP/Kontrola): MM, MF-pušači	<0,001
	Stanje(HOBP/Kontrola): MS,MZ, SZ -pušači	0,039
	Stanje(HOBP/Kontrola): MM, MF-nepušači	<0,001

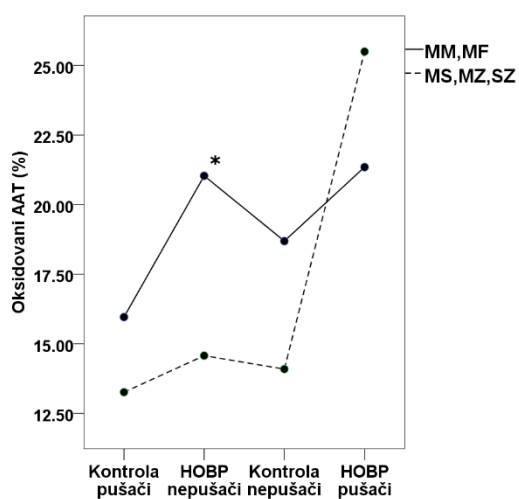
a.



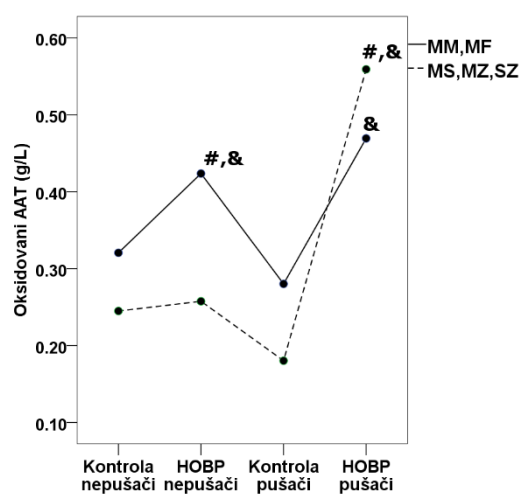
b.

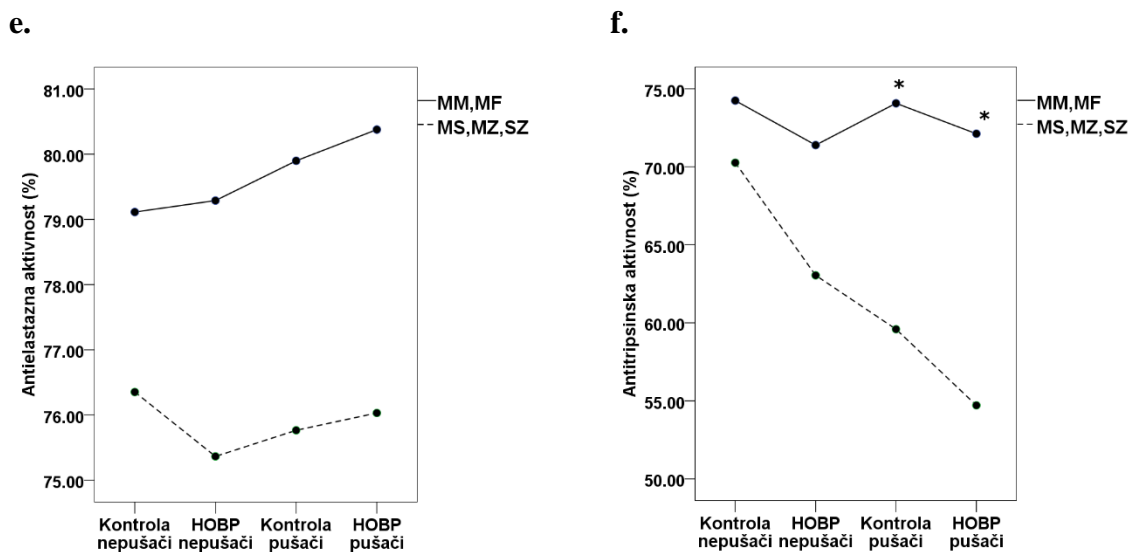


c.



d.





Slika 16. Uticaj fenotipa AAT (nedeficijentni MM, MF/deficijentni MS, MZ, SZ) u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata podeljenih prema pušačkom statusu na: a. SIA-elastaza (kU/g); b. SIA-tripsin (kU/g); c. oksidovani AAT (%); d. oksidovani AAT (g/L); e. Antielastazna aktivnost (%); f. Antitripsinska aktivnost (%). *MM,MF u odnosu na MS, MZ, SZ; ≠ pušači u odnosu na nepušače; & pacijenti u odnosu na kontrole.

Prisustvo HOBP, AAT fenotip (deficijentni: MS, MZ, SZ i nedeficijentni: MM, MF) i pušačkog statusa (pušači/nepušači) značajno je uticala na vrednost za SIA-tripsin ($p=0,015$). Daljom analizom pomoću testa po Šidaku, u grupi HOBP-pacijenata koji su bili nepušači, dobijene su značajno niže vrednosti za SIA-elastazu i SIA-tripsin kod ispitanika sa nedeficijentnim u odnosu na one sa deficijentnim fenotipovima ($p<0,001$; $p=0,002$, redom). U grupi HOBP pacijenata sa deficijentnim fenotipovima, pušači su imali značajno nižu vrednost za SIA-elastazu i SIA-tripsin u odnosu na nepušače ($p=0,009$, $p=0,001$, redom). U grupi pušača, vrednost za SIA-tripsin bila je značajno niža kod HOBP-pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike, nezavisno od toga da li su bili nosioci nedeficijentnih AAT ($p<0,001$) ili nosioci deficijentnih fenotipova ($p<0,001$). U grupi nepušača sa nedeficijentnim fenotipom, HOBP-pacijenti su imali značajno niži SIA-tripsin u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0,001$).

Statističkom analizom je dobijena značajna interakcija AAT fenotipa i statusa pušenja na antitripsinsku aktivnost ($p=0,039$). Rezultati Šidak testa pokazuju da su pušači, u obe grupe ispitanika (HOBP-pacijenti i kontrolna grupa), koji su bili nosioci deficijentnog fenotipa AAT imali značajno niže vrednosti antitripsinske aktivnosti u odnosu na nosioce nedeficijentnog fenotipa (redom, $p<0,001$; $p=0,007$).

Trofaktorska ANOVA nije pokazala značajan uticaj međusobne interakcije prisustva bolesti, AAT fenotipa i pušenja na nivo oksidovanog AAT (%) ($p=0,398$) i oksidovanog AAT u g/L ($p=0,198$). Međutim, primenom testa po Šidaku je pokazano da je kod HOBP-pacijenata nepušača nivo oksidovanog AAT, izražen u % i u g/L bio značajno viši kod ispitanika sa nedeficijentnim u odnosu na one sa deficijentnim fenotipom ($p=0,033$; $p=0,010$, redom). U grupi HOBP-pacijenata sa deficijentnim AAT fenotipovima nivo oksidovanog AAT (g/L) je bio značajno viši kod pušača u odnosu na nepušače ($p=0,014$). U grupi pušača, nezavisno od toga da li su bili nosioci nedeficijentnih ili deficijentnih AAT fenotipova, oksidovan AAT (g/L) bio je značajno viši kod HOBP-pacijenata u odnosu na zdrave osobe ($p<0,001$; $p=0,039$, redom). U grupi nepušača i nosilaca nedeficijentnih AAT fenotipova vrednost oksidovanog AAT (g/L) bila je značajno viša kod HOBP-pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike ($p<0,001$).

4.2.7 Analiza udruženog uticaja polimorfizma AAT i godina starosti na spirometrijske parametre kod pacijenata sa HOBP

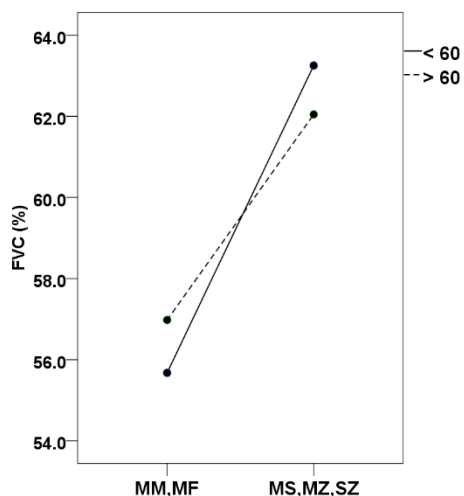
Kod pacijenata sa HOBP ispitivan je uticaj međusobne interakcije fenotipova AAT (klasifikovanog na nedeficijentne: MM, MF; i deficijentne: MS, MZ, SZ) i godina starosti (mlađi od 60 i stariji od 60 godina) na spirometrijske parametre (FVC, FEV1 i FV1/FVC) primenom dvofaktorske analize varijanse (Tabela 22., Slika 17.).

Tabela 22. Udruženi uticaj fenotipova AAT (nedeficijentni: MM, MF, n=138, deficijentni: MS, MZ, SZ, n=16) i godina starosti (< 60, n=47; >60, n=107) na spirometrijske parametre kod HOBP-pacijenata

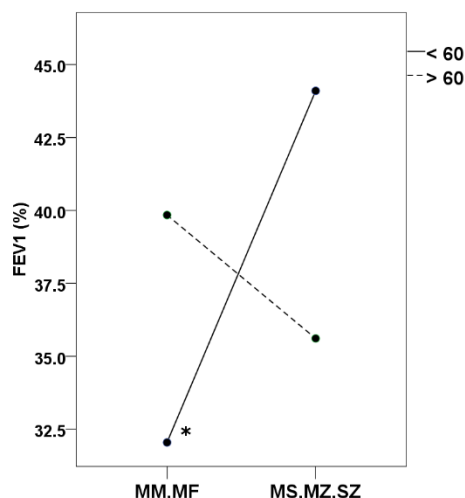
Biomarker	Uticaj interakcije faktora	p
FVC	Fenotip*Starost	0,940
	Uticaj interakcije faktora	
FEV1	Fenotip*Starost	0,267
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Starost: nedeficijentni	0,036
	Uticaj interakcije faktora	
FEV1/FVC	Fenotip*Starost	0,017
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Starost: nedeficijentni	0,001
	Fenotip AAT: starost <60	0,044
	Uticaj interakcije faktora	

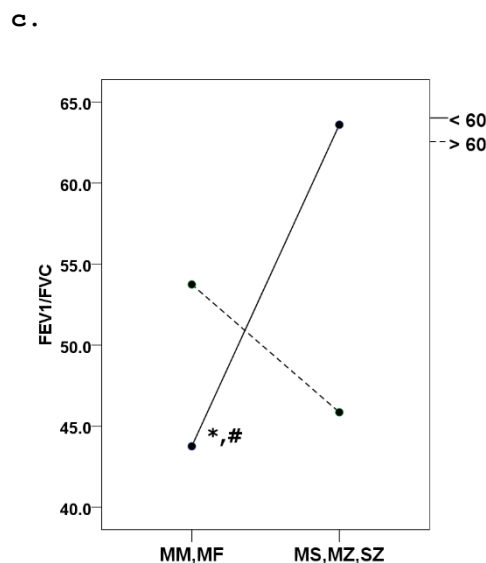
Dvofaktorska ANOVA je pokazala značajan uticaj međusobne interakcije AAT fenotipa i godina starosti na indeks FEV1/FVC ($p=0,017$), dok na vrednosti FVC i FEV1 nije bilo statistički značajnog uticaja (Tabela 22.). Primenom testa po Šidaku dokazano je da u grupi pacijenata nosilaca nedeficijentnog AAT fenotipa (MM, MF) značajno nižu vrednost FEV1 su imali ispitanici mlađi od 60 godina u odnosu na starije od 60 godina ($p=0,036$). U grupi nosilaca nedeficijentnog AAT fenotipa pacijenti mlađi od 60 godina imali su značajno nižu vrednost indeksa FEV1/FVC u odnosu na starije od 60 godina ($p=0,001$). Takođe, utvrđen je značajno niži FEV1/FVC indeks u grupi ispitanika mlađih od 60 godina kod nosilaca nedeficijentnih AAT fenotipova u odnosu na nosioce sa deficijentnim fenotipovima ($p=0,044$) (Slika 17.).

a.



b.





Slika 17. Uticaj fenotipa AAT (deficijentni: MS, MZ, SZ u odnosu na nedeficijentne: MM, MF) kod HOBP-pacijenata na spirometrijske parametre u dve starosne grupe (mlađi i stariji od 60 godina): a. FVC (%); b. FEV1 (%) i c. FEV1/FVC. *ispitanici stariji od 60 godina (>60) u odnosu na ispitanike mlađe od 60 godina (<60); # MS, MZ, SZ u odnosu na MM, MF.

4.2.8 Analiza udruženog uticaja M-subtipova AAT (MM homozigoti, MM heterozigoti), prisustva/odsustva HOBP i pušačkog statusa na funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT

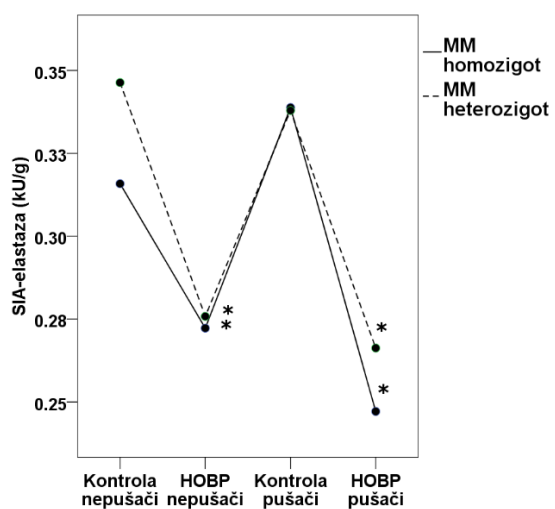
Da bi se ispitaio uticaj međusobnih interakcija stanja (prisustvo/odsustvo HOBP), M subtipova AAT (MM homozigoti/MM heterozigoti) i pušačkog statusa (pušač/nepušač) na vrednosti SIA-elastaze, SIA-tripsina, antielastazne i antitripsinske aktivnosti, kao i na nivo oksidovanog AAT (% i g/L) korišćena je trofaktorska analiza varijanse (Tabela 23., Slika 18.).

Tabela 23. Udruženi uticaj fenotipa AAT (MM homozigot/MM heterozigot) i statusa pušenja (pušač/nepušač) na funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT

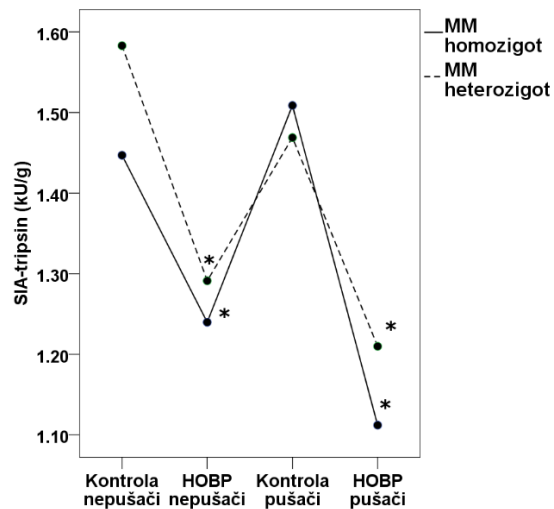
Biomarker	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
SIA-elastaza	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,217
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Stanje: MM homozigoti-nepušači	0,001
	Stanje: MM homozigoti-pušači	<0,001
	Stanje: MM heterozigoti-nepušači	<0,001
	Stanje: MM heterozigoti-pušači	0,001
SIA-tripsin	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,199
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Stanje: MM homozigoti-nepušači	0,001
	Stanje: MM homozigoti-pušači	<0,001
	Stanje: MM heterozigoti-nepušači	0,001
	Stanje: MM heterozigoti-pušači	0,009

Antielastazna aktivnost	Uticaoj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,340
Antitripsinska aktivnost	Uticaoj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,485
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Fenotip AAT: nepušači-pacijenti	0,019
Oksidovani AAT (%)	Uticaoj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,482
Oksidovani AAT (g/L)	Uticaoj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*Fenotip AAT*Pušački status	0,931

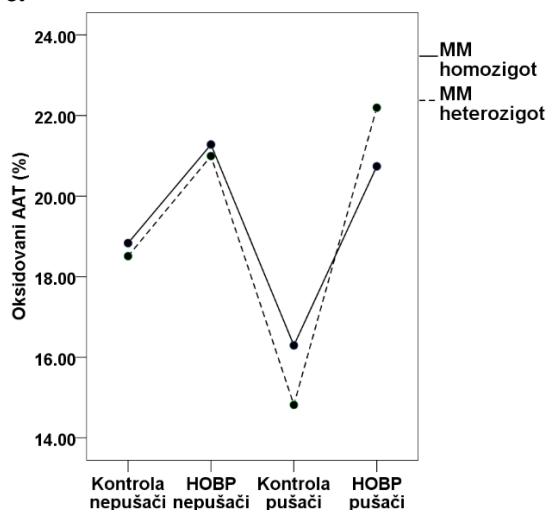
a.



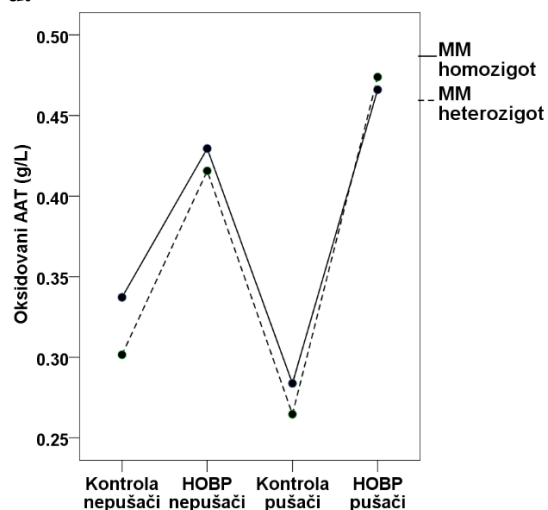
b.

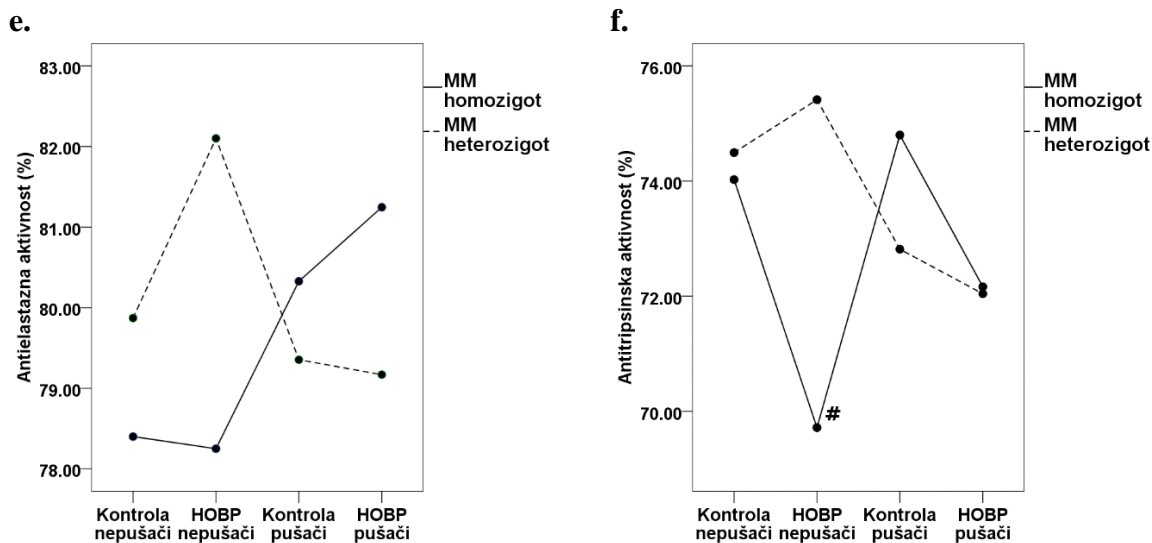


c.



d.





Slika 18. Uticaj HOBP i AAT fenotipa (MM homozygot, MM heterozygot) u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata podjeljenih na pušače i nepušače na vrednosti: a. SIA-elastaza (kU/g); b. SIA-tripsin (kU/g); c. oksidovani AAT (%); d. oksidovani AAT (g/L); e. Antielastazna aktivnost (%); f. Antitripsinska aktivnost (%). * pacijenti u odnosu na kontrole; # MM homozygoti u odnosu na MM heterozygote.

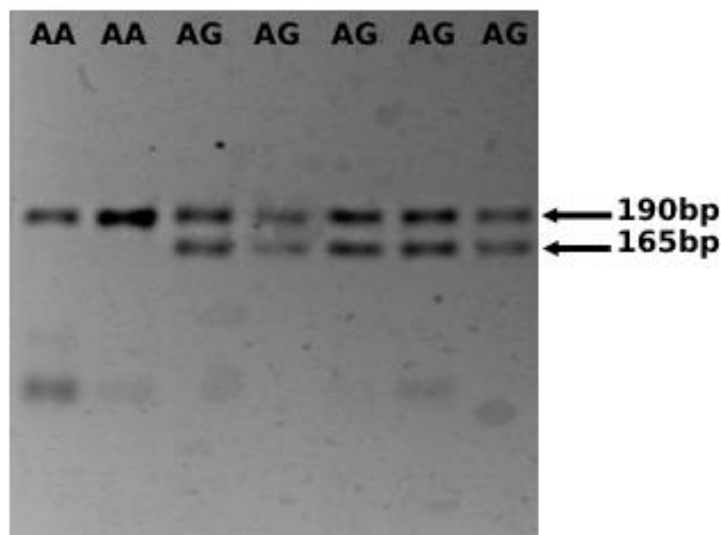
Primenom testa po Šidaku pokazano je da su pacijenti, nezavisno da li su bili MM homozygoti ili MM heterozygoti i nezavisno od pušačkog statusa pokazali značajno niže vrednosti SIA-elastaze (MM homozygoti-nepušači $p=0,001$; MM homozygoti-pušači $p<0,001$; MM heterozygoti-nepušači $p<0,001$; MM heterozygoti-pušači $p=0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Isto tako, nivo SIA-tripsina je bio značajno niži kod pacijenata, nezavisno da li su bili MM homozygoti ili MM heterozygoti i nezavisno od pušačkog statusa (MM homozygoti-nepušači $p=0,001$; MM homozygoti-pušači $p<0,001$; MM heterozygoti-nepušači $p=0,001$; MM heterozygoti-pušači $p=0,009$) u odnosu na kontrolnu grupu .

Post hoc test po Šidaku je pokazao da su u kontrolnoj grupi nepušača, MM homozygot imali niže vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina u odnosu na MM heterozygote, sa verovatnoćom vrlo blizu granice značajnosti (redom $p=0,057$, $p=0,077$).

Statistička analiza je pokazala da je na nivo antielastazne aktivnosti značajno uticala interakcija fenotipa AAT (MM homozygot/MM heterozygot) i pušačkog statusa ($p=0,033$). Primenom post hoc testa po Šidaku pokazano je da su u grupi HOBP-pacijenata nepušača, MM homozygoti imali nižu antielastaznu aktivnost u odnosu na MM heterozygote ($p=0,053$), sa graničnom značajnosti. Primena univarijantne analize je pokazala da postoji izvestan uticaj interakcije fenotipa AAT (MM homozygot, MM heterozygot) i pušenja na antitripsinsku aktivnost ($p=0,090$). Nakon primene Šidak testa utvrđeno je da su pacijenti nepušači koji su nosioci MM homozygotnog fenotipa imali značajno nižu antitripsinsku aktivnost u odnosu nosioce sa heterozygotnim AAT fenotipom ($p=0,019$).

4.3 Analiza polimorfizma metionin sulfoksid reduktaze A (MSRA rs10903323) i njegov značaj u razvoju HOBP

Na Slici 19. je prikazana elektroforetska analiza fragmenata dela MSRA gena u agaroznom gelu, dobijeni nakon digestije restrikcionim enzimom.



Slika 19. Identifikacija fragmenata nakon digestije

4.3.1 Analiza distribucije alela i genotipova MSRA rs10903323 u kontrolnoj grupi i kod HOBP pacijenata

Analizom genskih varijanti metionin sulfoksid reduktaze A (MSRA rs10903323) određena je distribucija alela i genotipova u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa HOBP-om. Poređenjem učestalosti analiziranih genotipova nije uočena statistički značajna razlika između kontrolne grupe i pacijenata ($p=0,289$). Takođe, nije bilo razlike u raspodeli nosilaca mutacije MSRA (genotipovi AG i GG) i onih koji nisu bili nosioci mutacije (genotip AA) između kontrolne grupe i pacijenata sa HOBP ($p=0,889$).

Frekvence analiziranih genskih varijanti u kontroli i kod HOBP-pacijenata su bile u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži ($p=0,380$ i $p=0,880$, redom) (Tabela 24.).

Tabela 24. Distribucija MSRA rs10903323 genotipova i alela u grupi HOBP-pacijenata i kontrolnoj grupi

Polimorfizam MSRA rs10903323	Kontrola (n=134)	HOBP-pacijenti (n=155)	p
Genotipovi			
A/A	108 (80,5)	124 (80,0)	0,887
A/G	24 (18,0)	31 (20,0)	0,654
G/G	2 (1,5)	0 (0)	0,214
A/G i G/G	26 (19,4)	31 (20,0)	0,887
Aleli			
A	240 (89,5)	279 (90,0)	0,862
G	28 (10,5)	31 (10,0)	0,862
H-W χ^2 (p)	0,25 (0,880)	1,91 (0,380)	

Rezultati u tabeli su prikazani kao broj n (%).

4.3.2 Ispitivanje povezanosti između polimorfizma MSRA rs1093323, funkcionalne aktivnosti AAT, nivoa oksidovanog AAT i težine bolesti

Daljom statističkom analizom ispitivana je razlika u vrednostima koncentracije AAT, funkcionalne aktivnosti AAT (SIA-elastaza, SIA-tripsin, antielastazna i antitripsinska aktivnost), oksidovanog AAT kod svih ispitanika u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata, potom razlika u parametrima plućne funkcije i težine bolesti u grupi pacijenata, kao i u odnosu na genske varijante MSRA rs10903323 (bez mutacije AA i sa prisutnom mutacijom AG i GG genotip) (Tabela 25.).

Tabela 25. Serumski nivo AAT, funkcionalna aktivnost AAT, oksidovani AAT (% i g/L) i parametri težine bolesti u odnosu na genske varijante MSRA rs10903323 bez mutacije (AA homozigoti) i sa prisutnom mutacijom (AG i GG heterozigoti)

Biomarkeri	MSRA rs10903323 genotip	Kontrola (n=134)	HOBP (n=155)	p
AAT (g/L)	AA	1,70±0,30	2,15±0,51	<0,001
	AG i GG	1,73±0,32	2,15±0,44	<0,001
SIA-Elastaza (kU/g)	AA	0,33±0,06	0,26±0,06	<0,001
	AG i GG	0,33±0,06	0,26±0,05	<0,001
SIA-Tripsin (kU/g)	AA	1,51±0,26	1,17±0,32	<0,001
	AG i GG	1,52±0,27	1,22±0,32	0,001
Antielastazna aktivnost	AA	79,39±5,14	78,53±7,98	0,370
	AG i GG	78,82±3,77	79,95±7,73	0,537
Antitripsinska aktivnost	AA	73,52±5,02	69,75±11,70	0,002
	AG i GG	74,61±3,58	71,41±11,68	0,172
Oksidovani AAT (%)	AA	17,39±6,33	18,91±8,37	0,154
	AG i GG	18,37±4,75	22,08±9,16	0,096
Oksidovani AAT (g/L)	AA	0,31±0,13	0,40±0,19	<0,001
	AG i GG	0,32±0,10	0,45±0,17	0,007
FVC	AA	-	55,18±22,58	0,209
	AG	-	61,84±27,17	
FEV1	AA	-	36,19±18,00	0,187
	AG	-	41,60±18,89	
FEV1/FVC	AA	-	50,70±14,00	0,781
	AG	-	51,56±13,14	
GOLD 2	AA	-	74,1	0,457*
	AG	-	25,9	
GOLD 3	AA	-	74,4	
	AG	-	25,6	
GOLD 4	AA	-	83,3	
	AG	-	18,7	
GOLD 3+4	AA	-	79,6	
	AG	-	20,4	

Vrednosti za kvantitativne promenljive su prikazane kao srednja vrednost ±Sd; GOLD klasifikacija je prikazana kao %. *razlika u učestalosti nosilaca MSRA rs10903323 AA ili AG genotipa prema težini bolesti

Vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina bile su značajno niže kod pacijenata u odnosu na zdrave, bez obzira na genotip MSRA.

Kod zdravih ispitanika je antielastazna aktivnost bila neznatno viša kod nosilaca AA genotipa, a kod pacijenata je neznatno viša kod nosilaca mutacije (AG i GG genotipa), bez statističke značajnosti. U grupi homozigota AA, antitripsinska aktivnost bila je značajno niža kod pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom ($p=0,002$), dok kod nosilaca AG ili GG genotipa nije utvrđena značajna razlika između zdravih i pacijenata.

Oksidovani AAT (g/L) je značajno viši kod pacijenata bez obzira na prisustvo/odsustvo mutacije na MSRA rs1093323 (kod nosilaca AA genotipa $p<0,001$; kod nosilaca AG+GG $p=0,007$).

Spirometrijski parametri funkcije pluća nisu pokazali značajnu razliku zavisno od prisustva/odsustva mutacije rs1093323 MSRA gena kod pacijenata sa HOBP.

Nije dobijena razlika u distribuciji homozigota AA i heterozigota AG u odnosu na težinu bolesti koja je procenjena prema GOLD klasifikaciji na tri grupe, srednje teški oblik (GOLD2), teški oblik (GOLD3) i vrlo teški oblik (GOLD 4) ($p=0,457$). Nakon podele pacijenata na dve grupe prema težini bolesti, na lakši (GOLD 2) i teži oblik (GOLD 3+4), takođe nije utvrđena značajna razlika u distribuciji genotipa AA i AG prema težini bolesti ($p=0,533$).

4.3.3 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323 i prisustva/odsustva HOBP na nivo AAT, funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT

Da bi se testirao uticaj interakcije stanja (prisustvo/odsustvo HOBP) i polimorfizma MSRA rs10903323 (AA/AG+GG) na parametre funkcionalne aktivnosti AAT (SIA-elastaza, SIA-tripsin, antielastazna i antitripsinska aktivnost) i nivo oksidovanog AAT primenjena je dvofaktorska analiza varijanse (Tabela 26.).

Tabela 26. Udruženi uticaj stanja (prisustvo/odsustvo HOBP), polimorfizma MSRA rs10903323 na parametre funkcionalne aktivnosti AAT i nivo oksidovanog AAT

Biomarkeri	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
SIA-elastaza (kU/g)	Stanje*MSRA polimorfizam	0,967
SIA-tripsin (kU/g)	Stanje*MSRA polimorfizam	0,656
Antielastazna aktivnost	Stanje*MSRA polimorfizam	0,371
Antitripsinska aktivnost	Stanje*MSRA polimorfizam	0,841
Oksidovani AAT (%)	Stanje*MSRA polimorfizam	0,376
Oksidovani AAT (g/L)	Stanje*MSRA polimorfizam	0,568

p – statistička značajnost $p<0,05$

Statističkom analizom nije pokazan značajan uticaj interakcije bolesti i mutacije rs10903323 na MSRA genu na parametre funkcionalne aktivnosti AAT i nivo oksidovanog AAT. Takođe, testiranje po Šidaku nije pokazalo statistički značajne razlike.

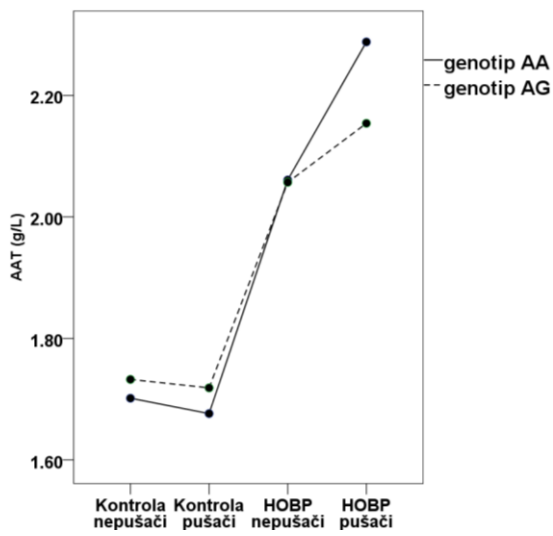
4.3.4 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323, prisustva/odsustva HOBP i pušačkog statusa na funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT

U cilju procene uticaja interakcije prisustva/odsustva bolesti, MSRA genske varijante (AA i AG+GG) i pušačkog statusa (pušač/nepušač) na SIA-elastazu, SIA-tripsin, antielastaznu i antitripsinsku aktivnost, kao i na nivo oksidovanog AAT korišćena je trofaktorska analiza varijanse (Tabela 27., Slika 20.).

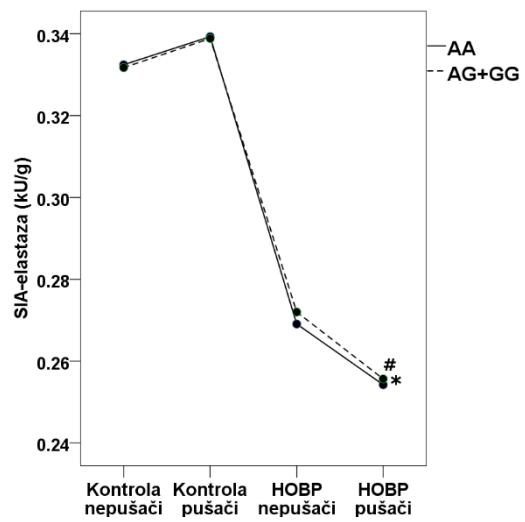
Tabela 27. Udruženi uticaj stanja (prisustvo/odsustvo HOBP), polimorfizma MSRA rs10903323 (AA/AG+GG) i pušačkog statusa (pušač/nepušač) na funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT

Biomarkeri	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
AAT (g/L)	Stanje*MSRA polimorfizam*Pušenje	0,437
SIA-elastaza (kU/g)	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*MSRA polimorfizam*Pušenje	0,703
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Stanje: AA-pušači	<0,001
	Stanje: AG+GG-nepušači	0,027
SIA-tripsin (kU/g)	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*MSRA polimorfizam*Pušenje	0,822
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Stanje: AA-pušači	<0,001
	Stanje: AG+GG-nepušači	0,013
Antielastazna aktivnost	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*MSRA polimorfizam*Pušenje	0,660
Antitripsinska aktivnost	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*MSRA polimorfizam*Pušenje	0,438
Oksidovani AAT (%)	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*MSRA polimorfizam*Pušenje	0,399
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Pušenje:AA-kontrola	0,043
	Stanje:AA-pušači	0,001
	Stanje: AG+GG-pušači	0,008
MSRA: paušači-pacijenti	0,028	
Oksidovani AAT (g/L)	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Stanje*MSRA polimorfizam*Pušenje	0,547
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Stanje: AA-pušači	<0,001
	Stanje: AG+GG-nepušači	0,002

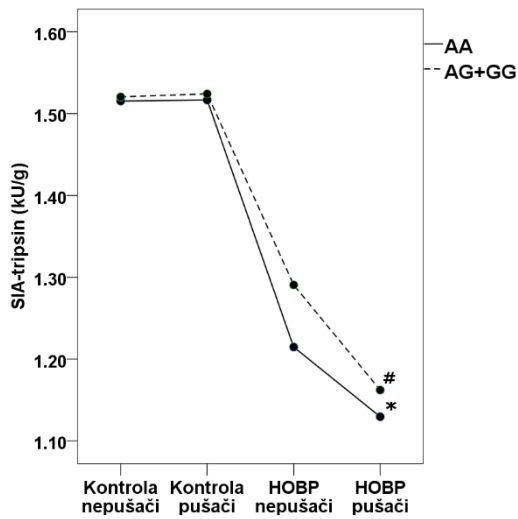
a.



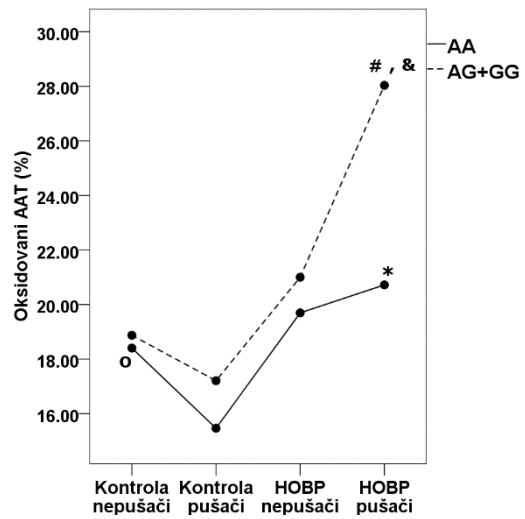
b.



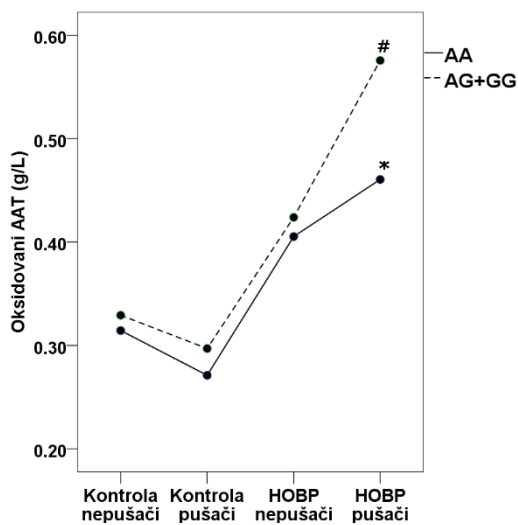
c.



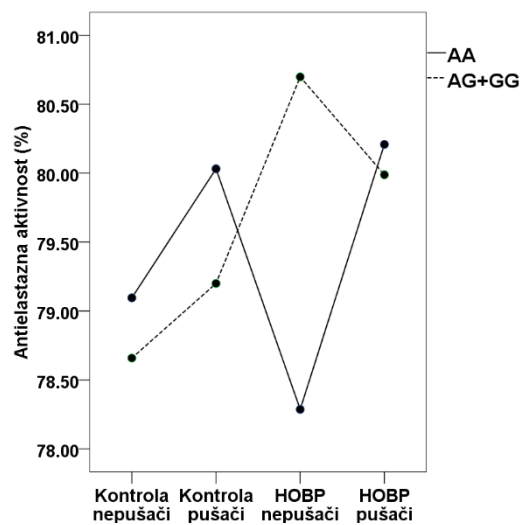
d.



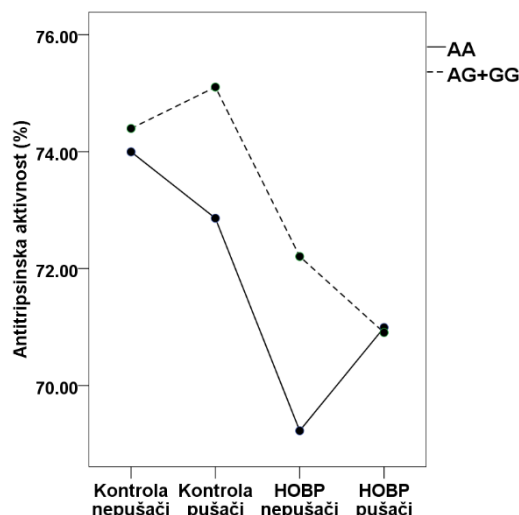
e.



f.



g.



Slika 20. Uticaj zdravstvenog stanja, genskih varijanti MSRA rs 10903323 i pušačkog statusa na vrednosti parametara funkcionalne aktivnosti AAT i oksidovanog AAT u kontrolnoj grupi i u grupi HOBP-pacijenata podeljenih prema pušačkom statusu: a. AAT (g/L); b. SIA-elastaza (kU/g); c. SIA-tripsin; d. oksidovani AAT (%); e. oksidovani AAT (g/L); f. antielastazna aktivnost (%); g. Antitripsinsku aktivnost (%). * AA-pušači: pacijenti u odnosu na zdrave; # AG-pušači: pacijenti u odnosu na zdrave; & pacijenti-pušači: AG u odnosu na AA; ○ zdravi: nepušači u odnosu na pušače.

Statističkom analizom je pokazano da se vrednost koncentracije AAT i SIA-elastaze nije razlikovala između ispitivanih grupa podeljenih prema zdravstvenom stanju (prisustvo/odsustvo bolesti) i genotipu MSRA rs10903323 ($p=0,437$; $p=0,909$), potom nije bilo razlike ni usled podele grupa prema zdravstvenom stanju i pušačkom statusu ($p=0,358$) (Tabela 27.). Takođe, analizom nije pokazana značajna razlika za vrednost SIA-elastaze pri podeli grupa prema pušačkom statusu i prisustvu genotipa ($p=0,980$), kao ni pri podeli prema sva tri primenjena kriterijuma (prisustvo/odsustvo bolesti, pušački status, genotip MSRA rs 10903323) ($p=0,703$). Primenom Šidak post hoc testa, pokazano je da je nivo SIA-elastaze značajno snižen kod pacijenata pušača u odnosu na zdrave pušače, kako u grupi nosilaca AA genotipa ($p<0,001$), tako i kod nosilaca AG+GG genotipa ($p=0,027$).

Primenom tro-faktorskog ANOVA testa, utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike u vrednosti SIA-tripsina interakcijom promenljivih varijabli prisustvo/odsustvo bolesti, pušačkog statusa i genotipa MSRA rs 10903323 (Tabela 27.). Rezultati post hoc Šidak testa kod pušača pokazuju značajno snižene vrednosti SIA-tripsina kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu kod nosilaca AA genotipa ($p<0,001$), kao i kod nosilaca AG+GG genotipa ($p=0,013$).

Upotrebom univarijantne analize za ispitivanje razlike za vrednosti antielastazne i antitripsinske aktivnosti usled podele grupa prema zdravstvenom stanju, MSRA rs10903323 genotipu i pušačkom statusu nisu dobijeni statistički značajni rezultati (Tabela 30.).

Statistička analiza je pokazala da interakcija prisustva/odsustva HOBP i pušačkog statusa pokazuje značajan uticaj na oksidovani AAT (%) ($p=0,017$). Daljom analizom pomoću Šidak testa analizirana je razlika za vrednosti oksidovanog AAT (%) između zdravih i pacijenata koji se razlikuju prema MSRA rs10903323 genotipu i pušačkom statusu. Nosioci AA genotipa u kontrolnoj grupi koji su bili nepušači imali su značajno više vrednosti oksidovanog AAT (%) kod u odnosu na pušače ($p=0,043$). Nosioci AG genotipa u grupi pacijenata pokazivali su više vrednosti oksidovanog AAT (%) kod

pušača nego nepušača, sa graničnom značajnošću ($p=0,056$). U populaciji pušača, pacijenti su u odnosu na kontrolnu grupu imali viši nivo oksidovanog AAT (%) i u grupi nosilaca AA genotipa ($p=0,001$) i u grupi nosilaca AG+GG genotipa ($p=0,008$). U grupi pacijenata pušača nivo oksidovanog AAT (%) bio je značajno viši kod nosilaca AG u odnosu na AA genotip ($p=0,028$).

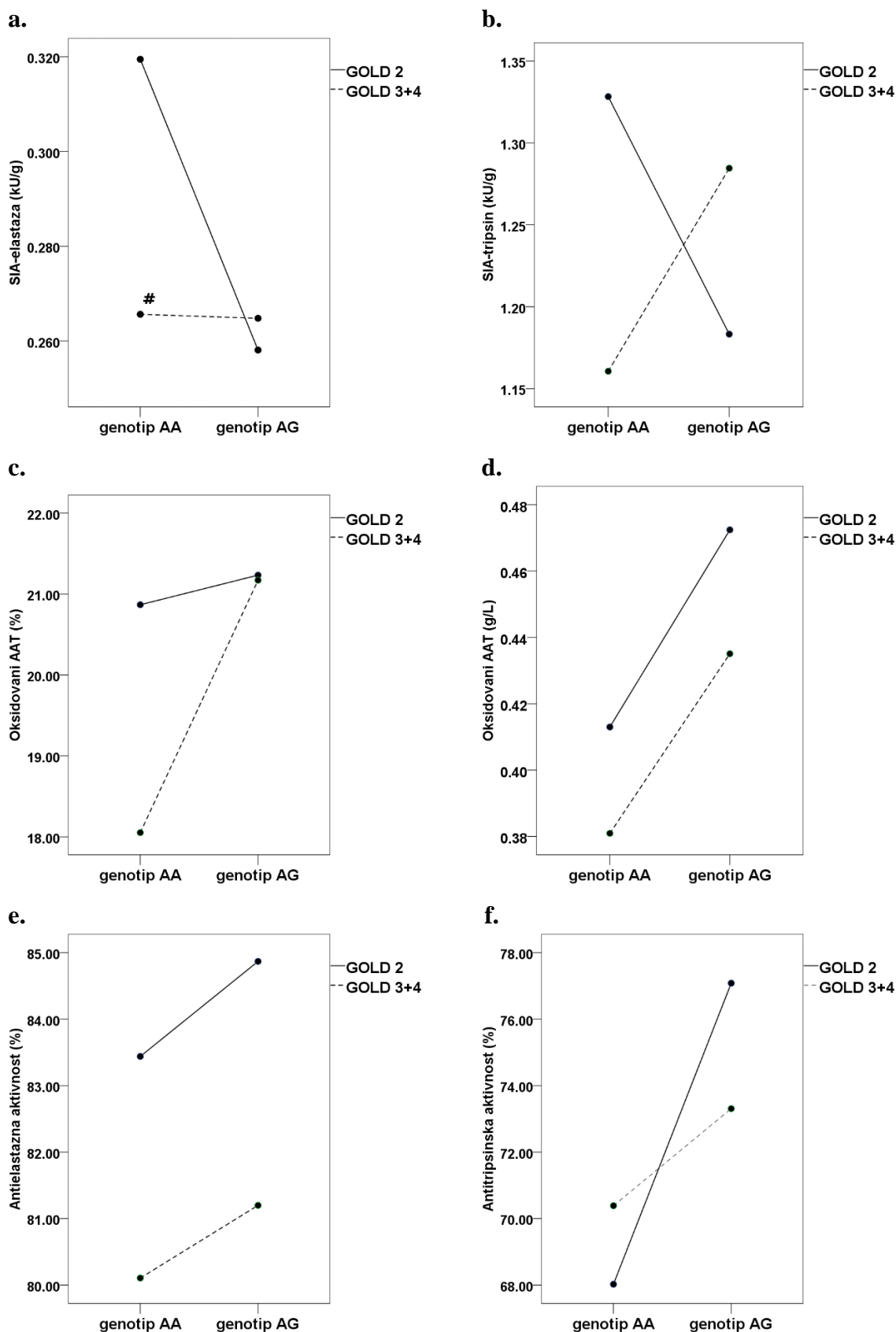
Primenom trofaktorskog ANOVA testa utvrđeno je da na nivo oksidovanog AAT (g/L) značajno utiče interakcija prisustva bolesti i statusa pušenja ($p=0,014$). Upotrebom Šidak testa ispitivana je razlika u nivou oksidovanog AAT (g/L) zavisno od prisustva bolesti i pušačkog statusa kod pacijenata i kontrolne grupe podeljenih prema MSRA rs10903323 genotipu. Kod ispitanih pušača, pacijenti su imali statistički značajno viši nivo oksidovanog AAT (g/L) u odnosu na kontrolnu grupu kod ispitanika sa AA genotipom ($p<0,001$) i kod ispitanika sa AG+GG genotipom ($p=0,002$). U grupi pacijenata nosilaca AG+GG genotipa pušači su imali viši nivo oksidovanog AAT (g/L) u odnosu na nepušače, sa graničnom značajnošću ($p=0,056$).

4.3.5 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323 i težine HOBP na funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT kod HOBP-pacijenata

Interakcija polimorfizma MSRA rs10903323 i težine HOBP (GOLD 2, 3+4) na funkcionalnu aktivnost AAT i oksidovani AAT testirana je primenom dvofaktorske analize varijanse (Tabela 28., Slika 21.).

Tabela 28. Udruženi uticaj polimorfizma MSRA rs10903323 i težine HOBP (GOLD 2, 3+4) na funkcionalnu aktivnost AAT i oksidovani AAT

Biomarkeri	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
SIA-elastaza	MSRA polimorfizam*Težina HOBP	0,205
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	GOLD (2,3+4): MSRA AA	0,026
SIA-tripsin	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	MSRA polimorfizam*Težina HOBP	0,189
Antielastazna aktivnost	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	MSRA polimorfizam*Težina HOBP	0,956
Antitripsinska aktivnost	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	MSRA polimorfizam*Težina HOBP	0,393
Oksidovani AAT (%)	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	MSRA polimorfizam*Težina HOBP	0,629
Oksidovani AAT (g/L)	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	MSRA polimorfizam*Težina HOBP	0,965



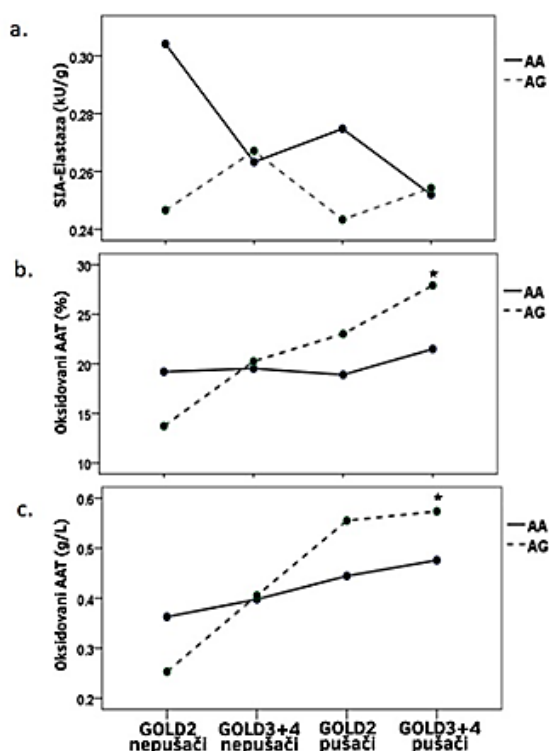
Slika 21. Povezanost genskih varijanti MSRA rs 10903323 i vrednosti parametara funkcionalne aktivnosti AAT i oksidovanog AAT kod HOBP-pacijenata prema težini bolesti (grupe: GOLD 2 i GOLD 3+4): a. SIA-elastaza (kU/g); b. SIA-tripsin (kU/g); c. oksidovani AAT (%); d. oksidovani AAT (g/L); e. Antielastazna aktivnost (%); f. Antitripsinska aktivnost (%). # GOLD3+4 u odnosu na GOLD2.

Primena testa dvofaktorska ANOVA nije pokazala statistički značajan uticaj genske varijante MSRA rs10903323 na parametre antiproteazne aktivnosti i vrednosti oksidovanog AAT kod pacijenata sa HOBP koji su bili podeljeni prema težini bolesti na lakši (GOLD 2) i teži oblik (GOLD 3+4).

Primenom post hoc testa po Šidaku utvrđeno je da u grupi pacijenata koji su nosioci AA genotipa, značajno niže vrednosti SIA-elastaze imaju ispitanici sa težim oblikom bolesti u odnosu na lakši (p=0,026).

4.3.6 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323, težine HOBP i pušačkog statusa na funkcionalanu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT kod HOBP-pacijenata

Radi ispitivanja uticaja MSRA rs10903323 polimorfizma, težine HOBP (GOLD2 i GOLD3+4) i pušačkog statusa (pušač, nepušač) na nivo SIA-elastaze i oksidovanog AAT (% , g/L) primenjena je trofaktorska analize varijanse (Slika 22.)



Slika 22. Uticaj MSRA rs10903323 polimorfizma na SIA-elastazu i nivo oksidovanog AAT kod HOBP pacijenata podeljenih na dve grupe prema težini bolesti (GOLD1, GOLD3+4) i pušačkom statusu (pušač, nepušač): a. SIA-elstaza; b. Oksidovani AAT (%); c. Oksidovani AAT (g/L); ★ pacijenti pušači sa težim oblikom bolesti (GOLD3+4): AA u odnosu na AG

Ukoliko se razmatra udruženi uticaj MSRA rs10903323 polimorfizma, težine HOBP i pušačkog statusa analiza je utvrdila da ne postoji statistički značajna razlika kod HOBP pacijenata za vrednosti SIA-elastaze (p=0,471), oksidovanog AAT (%) (p=0,399) oksidovanog AAT (g/L) (p=0,547). Primenom post hoc testa po Šidaku utvrđeno je da u grupi pacijenata sa teškim i vrlo teškim oblikom bolesti (GOLD3+4) postoji tendencija da je oksidovani AAT (%) viši kod nosilaca G alela u odnosu na nosioce AA genotipa (p=0,086) (Slika 22.). Dalja analiza, primenom t-testa pokazala je da su pacijenti pušači sa teškim i vrlo teškim oblikom bolesti (GOLD3+4) imali značajno viši oksidovani AAT (% , g/L) kod nosilaca G alela u odnosu na AA homozigotne (redom, p<0,001, p=0,04, redom) (Slika 22 b, c.).

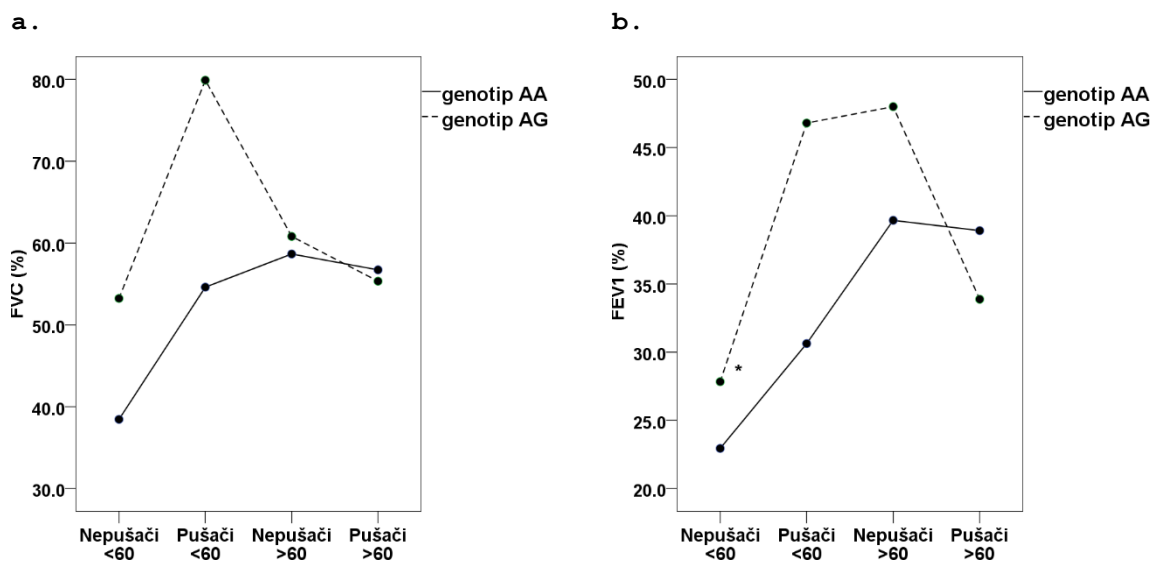
4.3.7 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323, godina starosti i pušačkog statusa na spirometrijske parametre kod HOBP-pacijenata

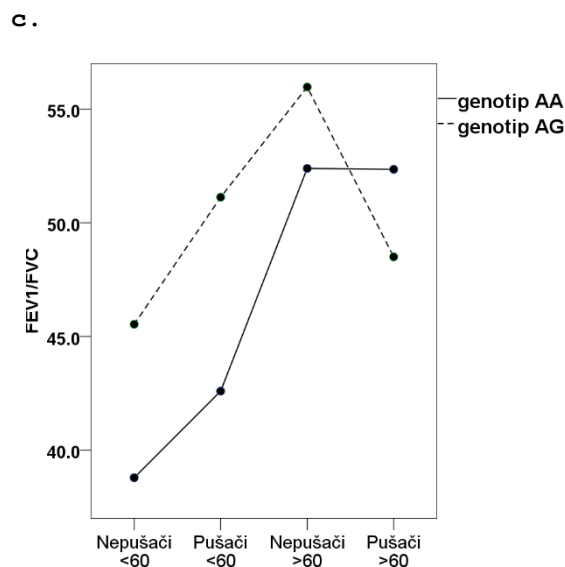
Da bi se ispitaio međusobni uticaj polimorfizma MSRA rs10903323, statusa pušenja (pušač/nepušač) i godina starosti (< 60, >60) na spirometrijske parametre FVC, FEV1 i FEV1/FVC u grupi pacijenata korišćena je trofaktorska univarijantna analiza. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 29 (Slika 23.).

Tabela 29. Udruženi uticaj polimorfizma MSRA rs10903323, statusa pušenja (pušač/nepušač) i godina starosti (< 60, >60) na spirometrijske parametre

Biomarker	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
FVC	Polimorfizam MSRA*Statusa pušenja*Starost	0,427
FEV1	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Polimorfizam MSRA*Statusa pušenja*Starost	0,212
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Starost: AA-nepušači	0,031
FEV1/FVC	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Polimorfizam MSRA*Statusa pušenja*Starost	0,260

Utvrđena je statistički značajna interakcija pušenja i starosti pacijenata na vrednost FEV1 ($p=0,037$). Takođe, utvrđen je statistički značajan individualni uticaj godina starosti na vrednost indeksa FEV1/FVC ($p=0,042$) (Tabela 29.).





Slika 23. Uticaj MSRA genskih varijanti (AA i AG) i statusa pušenja (pušač/nepušač) na spirometrijske parametre kod pacijenata podjeljenih prema starosti (mlađi i stariji od 60 godina). a. FVC; b. FEV1; c. FEV1/FVC .

Primenom post hoc testa po Šidaku ispitivan je uticaj MSRA genotipa kod pacijenata pušača i nepušača koji su podjeljeni u dve grupe prema starosnoj dobi, na mlađe i starije od 60 godina. Utvrđeno je da su vrednosti FVC u grupi pušača mlađih od 60 godina bile niže kod nosilaca AA u odnosu na nosioce AG genotipa, sa graničnom značajnošću ($p=0,059$). U grupi nepušača nosilaca AA genotipa, pacijenti mlađi od 60 godina imali su značajno nižu FEV1 vrednost u odnosu na pacijente starije od 60 godina ($p=0,031$). Takođe u grupi nepušača nosilaca AA genotipa, vrednosti odnosa FEV1/FVC bile su niže kod pacijenata mlađih od 60 godina u odnosu na starije ispitanike, sa graničnom značajnošću ($p=0,087$) (Slika 23.).

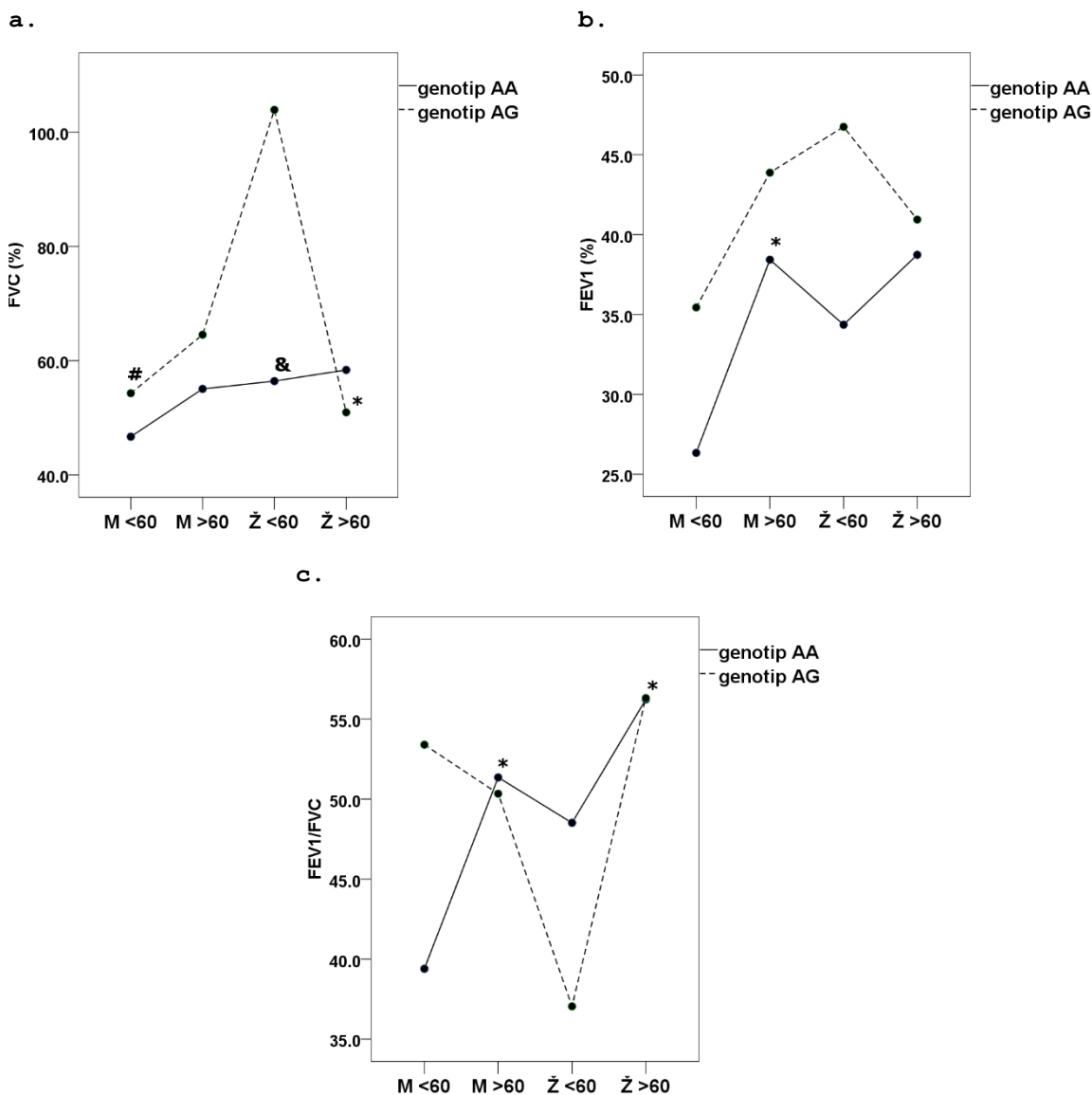
4.3.8 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323, pola i godina starosti na spirometrijske parametre kod HOBP-pacijenata

Ispitivanje međusobnih interakcija pola (ženski/muški), godina starosti (mlađi od 60 i stariji od 60 godina) i polimorfizma MSRA rs10903323 na parametre funkcije pluća (FVC, FEV1 i FEV1/FVC) ispitivano je primenom testa tro-faktorske analize varijanse (Tabela 30., Slika 24.).

Tabela 30. Udruženi uticaj pola (ženski/muški), godina starosti (>60/>60 godina) i polimorfizma MSRA rs10903323 na spirometrijske parametre

Biomarker	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
FVC	Pol*starost*polimorfizam MSRA	0,013
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Starost: žene-AG	0,004
	Pol: AG-<60	0,010
	MSRA: <60-žene	0,006
FEV1	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Pol*starost*polimorfizam MSRA	0,736
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Starost: muškarci-AA	0,040

FEV1/FVC	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Pol*starost*polimorfizam MSRA	0,078
	Post hoc analiza po Šidak-u	
	Starost: žene-AA	0,044
Starost: muškarci-AA	0,024	



Slika 24. Povezanost između polimorfizma MSRA rs10903323 (AA i AG) i funkcije pluća procenjene na osnovu spirometrijskih parametara u odnosu na pol (muški/ženski) i starost (< 60 godina, >60 godina). a. FVC; b. FEV1; c. FEV1/FVC. *>60 u odnosu na <60; ≠ muški pol u odnosu na ženski; & AA u odnosu na AG.

Statistička analiza je pokazala značajan uticaj interakcija starosti i pola na vrednost FVC ($p=0,007$). Međusobna interakcija godina starosti, pola i MSRA genotipa uticala je na vrednost FVC ($p=0,013$), kao i na vrednost indeksa FEV1/FVC, sa graničnom značajnošću ($p=0,078$).

Rezultati Šidak testa pokazuju da su pacijenti ženskog pola nosioci AG genotipa imali značajno nižu vrednost FVC ukoliko su stariji od 60 godina u odnosu na mlađe od 60 godina ($p=0,004$). U grupi

nosilaca AG genotipa koji su mlađi od 60 godina muškarcima su imali značajno nižu vrednost FVC u odnosu na žene ($p=0,010$). Žene starosti do 60 godina imale su značajno niži FVC u grupi nosilaca AA genotipa u odnosu na AG genotip ($p=0,006$). Muškarcima mlađi od 60 godina nosioci AA genotipa imali su značajno nižu vrednost FEV1 u odnosu na starije od 60 godina ($p=0,040$). Značajno nižu vrednost indeksa FEV1/FVC imali su nosioci AA genotipa koji su mlađi od 60 godina u odnosu na starije od 60 godina, kako u grupi žena ($p=0,044$), tako i kod muškaraca ($p=0,024$).

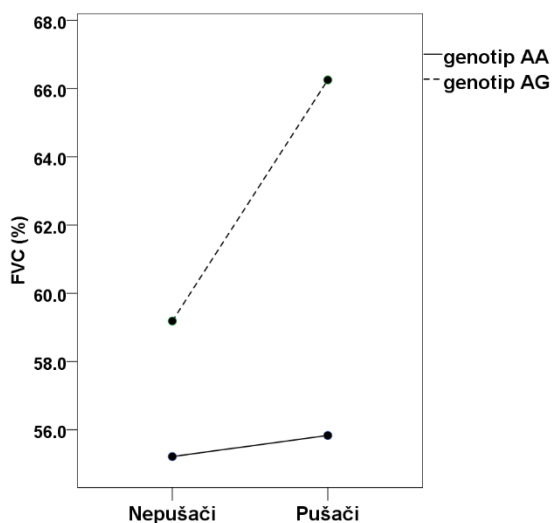
4.3.9 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323 i pušačkog statusa na spirometrijske parametre kod HOBP-pacijenata

U grupi pacijenata sa HOBP je ispitivan pojedinačni i međusobni uticaj MSRA genske varijante (AA i AG) i statusa pušenja (pušač/nepušač) na spirometrijske parametre FVC, FEV1, FEV1/FVC dvofaktorskom analizom varijanse (Tabela 31., Slika 25.).

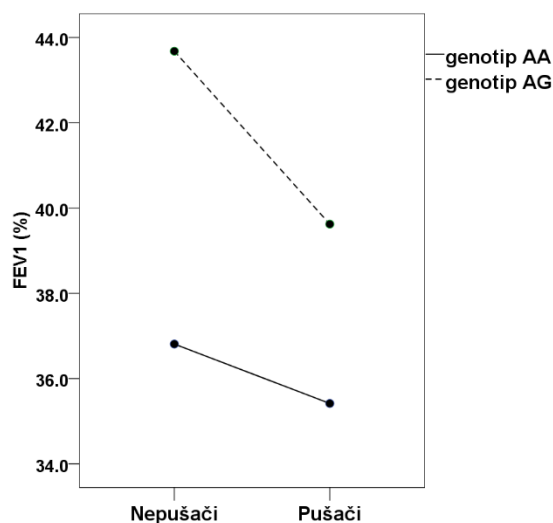
Tabela 31. Udruženi uticaj polimorfizma MSRA rs10903323 gena (AA i AG), statusa pušenja (pušač/nepušač) na spirometrijske parametre kod pacijenata sa HOBP

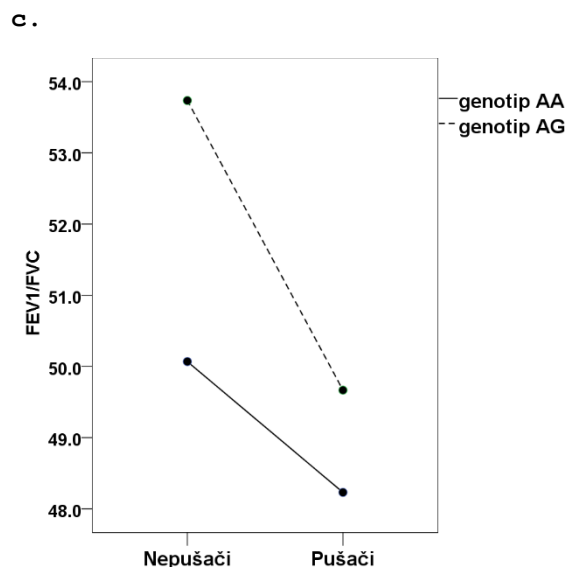
Biomarker	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
FVC	Polimorfizam MSRA*Pušački status	0,515
FEV1	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Polimorfizam MSRA*Pušački status	0,770
FEV1/FVC	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Polimorfizam MSRA*Pušački status	0,818

a.



b.





Slika 25. Povezanost između polimorfizma MSRA rs10903323 (AA i AG) i funkcije pluća procenjene na osnovu spirometrijskih parametara u odnosu na pušački status (pušači, nepušači). a. FVC; b. FEV1; c. FEV1/FVC

Primenom dvo-faktorskog ANOVA testa nisu dokazani značajni pojedinačni uticaji pušenja i rs10903323 MSRA genotipa na parametre spirometrije, kao ni značajan uticaj interakcije pušenja i genotipa (Tabela 31.). Post hoc analiza po Šidaku, takođe nije pokazala statistički značajne razlike.

4.4 Povezanost između polimorfizma MSRA rs10903323, polimorfizma AAT i funkcije pluća kod pacijenata sa HOBP

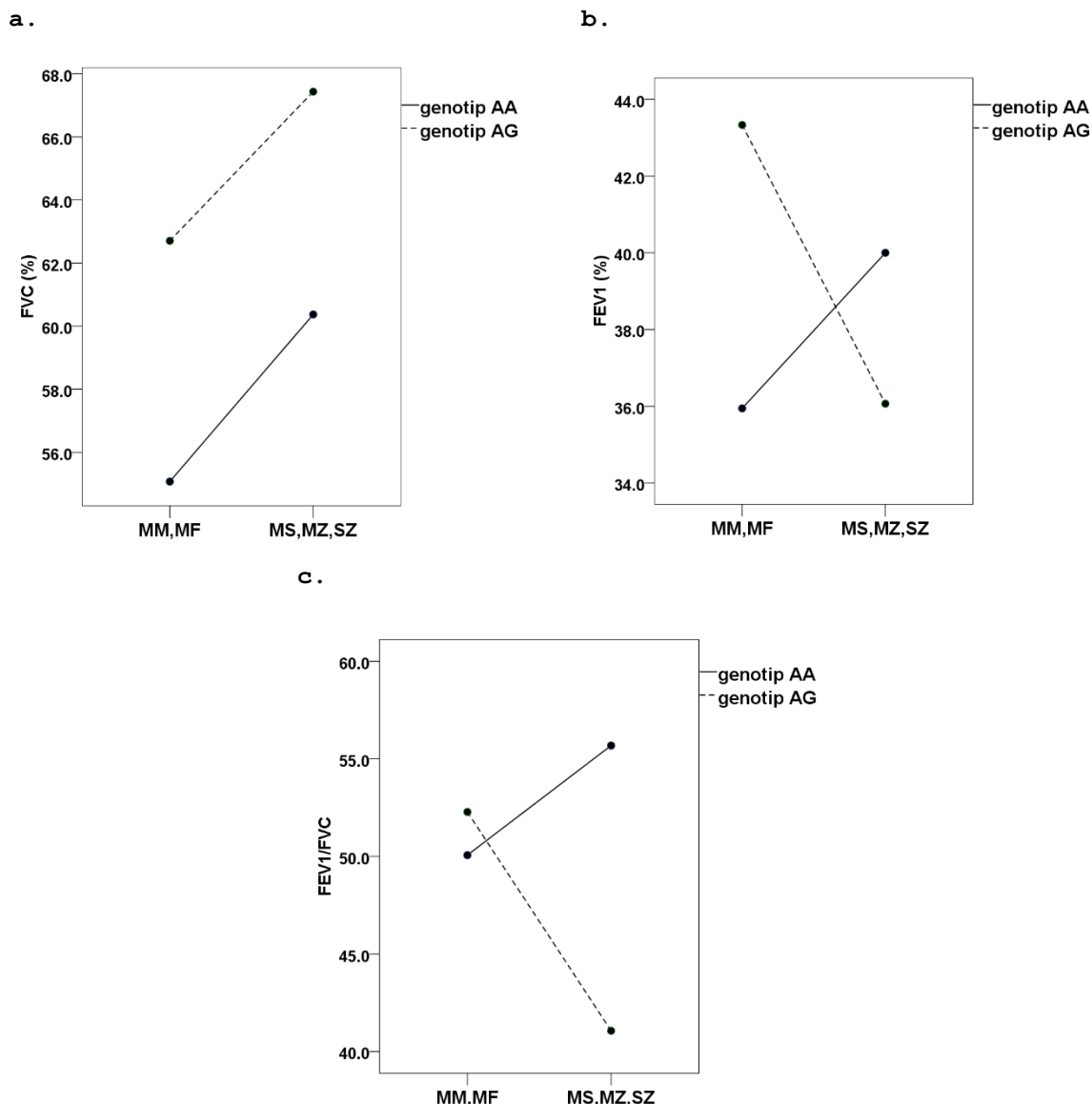
Ova studija je obuhvatila i ispitivanje udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323 i varijanti AAT na spirometrijske parametre kod HOBP-pacijenata.

4.4.1 Analiza udruženog uticaja polimorfizma MSRA rs10903323 (AA/AG) i polimorfizma AAT (nedeficijentni MM, MF/deficijentni MS, MZ, SZ) na parametre plućne funkcije kod pacijenata sa HOBP

Da bi se ispitaio uticaj polimorfizma MSRA rs10903323 (AA/AG) i polimorfizma AAT klasifikovanih na nedeficijentne (MM, MF) i deficijentne (MZ, MS, SZ) na parametre plućne funkcije FVC, FEV1 i indeks FEV1/FVC korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (Tabela 32., Slika 26.).

Tabela 32. Udruženi uticaj polimorfizma MSRA rs10903323 (AA/AG) i polimorfizma AAT (deficijentni: MS,MZ,SZ /nedeficijentni MM,MF) na parametre plućne funkcije kod pacijenata sa HOBP

Zavisna promenljiva	Uticaj faktora i njihove interakcije	p
FVC	Polimorfizam MSRA*polimorfizam AAT	0,990
FEV1	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Fenotip AAT(MM,MF/MS,MZ,SZ)*MSRA(AA/AG)	0,409
FEV1/FVC	Uticaj faktora i njihove interakcije	
	Fenotip AAT(MM,MF/MS,MZ,SZ)*MSRA(AA/AG)	0,058



Slika 26. Uticaj genotipa MSRA (AA/GG) na parametre plućne funkcije kod HOBP-pacijenata podjeljenih prema fenotipu AAT na nedeficijentne (MM, MF) i deficijentne (MS, MZ, SZ)

Test dvofaktorska ANOVA je pokazao da međusobna interakcija MSRA rs10903323 genotipa (AA/AG) i fenotipa AAT (MM, MF/ MS, MZ, SZ) utiče na vrednost indeksa FEV1/FVC, sa graničnom značajnošću ($p=0,058$). Ispitivanje je pokazalo da su pacijenti nosioci deficijentnih AAT fenotipova (MS, MZ, SZ) koji su bili i nosioci MSRA alela G (AA/GG) imali nižu vrednost indeksa FEV1/FVC u odnosu na MSRA homozogote AA, sa graničnom značajnošću ($p=0,073$).

4.5 Analiza nezavisnih prediktora za pojavu HOBP

Binarnom logističkom regresijom ispitivan je prediktorski potencijal parametara za nastanak HOBP kod ispitanika u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata. Parametri koji su obuhvaćeni modelom binarne logističke regresione analize su SIA-elastaza, oksidovani AAT (g/L), starost preko 60 godina, pušenje i deficijentni fenotipovi AAT (Tabela 33).

U ispitivanim populacijama, ovaj model logističke regresije je objasnio između 49,6% (Cox and Snell R square) i 66,2% (Nagelkerke R squared) varijanse u razvoju HOBP. Dobijen model, sa svim

navedenim prediktorima, imao je statističku značajnost, χ^2 (df=5, N=216) =148,056, p<0,001). Statističkom analizom je pokazano da najbolju prediktorsku moć za pojavu HOBP ima povišen nivo oksidovanog AAT, izražen u g/L. Pored toga, snižen nivo SIA-elastaze predstavlja nezavisni prediktor za pojavu HOBP (p=0,043), kao i povišen nivo oksidovanog AAT (g/L), starost preko 60 godina i pušenje (p<0,05). Deficijentni fenotipovi AAT (MZ, MS, SZ) predstavljaju, takođe, nezavisne prediktore za pojavu HOBP (verovatnoća je bila veoma blizu granice značajnosti, p=0,054). Porast koncentracije oksidovanog AAT za jedinicu povećava 996,7 puta mogućnost da osoba oboli od HOBP. Osobe starije od 60 godina imaju 99,2 puta veću šansu za pojavu HOBP u odnosu na mlađe od 60 godina, dok pušači imaju 4,3 puta veću šansu u odnosu na nepušače. Nosioci deficijentnih fenotipova AAT (MS, MZ, SZ) imaju 47,8 puta više šansi da obole od HOBP u odnosu na nosioce nedeficijentnih fenotipova.

Tabela 33. Analiza nezavisnih prediktora pojave HOBP primenom binarnog modela logističke regresione analize

Prediktor	B (SE)	p	OR (95 %)
SIA-elastaza	-6,507 (3,222)	0,043	0,412 (0,000-0,825)
Oksidovani AAT (g/L)	4,286 (1,690)	0,011	996,719 (2,646-1996,084)
Osobe starije od 60 godina	4,222 (0,598)	<0,001	99,184 (21,078-219,446)
Pušači	1,411 (0,463)	0,002	4,257 (1,654-10,169)
AAT deficijentni fenotipovi (MZ, MS i SZ)	2,263 (1,177)	0,054	47,765 (0,958-96,489)
Konstanta	-1,584 (1,434)	0,269	–
Celokupan model	χ^2 (df=5, N=216) =148,056, p<0,001		

B-koeficijent regresije; SE-standardna greška za B; OR (95% CI)-eng. odds ratio (95% interval pouzdanosti); χ^2 -test-chi kvadrat test; p-statistička značajnost (p<0,05); SIA-elastaza- specifična inhibitorna aktivnost alfa-1-antitripsina prema elastazi.

5. Diskusija

Kako je HOBP multifaktorijalna bolest, tačan uzrok, kao ni uticaj faktora rizika i njihove interakcije na nastanak i razvoj ove bolesti i dalje nije potpuno razjašnjen.

Jedini genetički faktor, za koji je do sada potvrđeno da je faktor rizika za HOBP, je urođena deficijencija AAT. Pored toga, najznačajniji sredinski faktor za razvoj HOBP je dim cigareta [109]. Homozigoti za Z alel AAT imaju visoku predispoziciju za pojavu emfizema HOBP, posebno ukoliko su pušači [151, 152].

Značajan broj dosadašnjih istraživanja obuhvatio je uzroke oksidacije AAT, kao i posledice ove promene, koje se odražavaju kroz njegovu smanjenu antiproteaznu aktivnost i doprinose pojavi i razvoju HOBP [153, 35]. Među vodećim uzročnicima oksidacije AAT smatra se pušenje, kao i štetni agensi poreklom iz zagađenog vazduha. [154]. Izuzev uticaja faktora iz spoljašne sredine na pojavu HOBP, značajan doprinos razvoju bolesti pripada genetičkim faktorima i njihovoj interakciji sa spoljašnjim i unutrašnjim faktorima (pol, godine, komorbiditeti), koji su nedovoljno ispitani [155].

Prema našim saznanjima, na osnovu do sada dostupnih naučnih podataka, u ovoj studiji je po prvi put ispitan polimorfizam rs10903323 u genu MSRA u populaciji Srbije. Takođe, ovo je prvo istraživanje, kojim je ispitana povezanost između MSRA rs10903323 polimorfizma i pojave HOBP.

5.1 Uticaj pušenja, pola i starosti na nivo AAT, oksidaciju AAT i funkcionalnu aktivnost AAT i povezanost sa pojavom i razvojem HOBP

Kako je poznato da je inflamacija prisutna u HOBP, u ovoj studiji je očekivano dobijena povišena koncentracija AAT kao reaktanta akutne faze kod pacijenta obolelih od HOBP u odnosu na zdrave ispitanike (Tabela 10.). Rezultati naše studije bili su skladu sa rezultatima više dosadašnjih studija. Jedna studija pokazuje značajno povišen serumski nivo AAT kod HOBP pacijenata i u skladu je sa povećanjem broja leukocita i vrednosti CRP [156]. Povećana koncentracija AAT može se javiti kao odgovor na povećano oslobađanje elastaze iz aktiviranih neutrofila, u cilju zaštite tkiva od proteolitičkog dejstva ovog enzima [157]. Takei i saradnici [158] su u svojoj studiji potvrdili pojavu povišenog nivoa AAT kod pacijenata sa HOBP, koji je vezan za pogoršanje sistemske inflamacije i povećanje nivoa drugih inflamatornih faktora, kao i veću verovatnoću za smrtni ishod kod HOBP pacijenata koji nisu ispunjavali kriterijume za AATD. Takođe, u jednom istraživanju potvrđen je značajno povišen nivo AAT u kondenzatu izdahnutog vazduha kod pacijenata sa HOBP u fazi egzacerbacije [159]. Ingebrigsten i saradnici [160] su u istraživanju pokazali da su povišeni nivoi AAT i fibrinogena, dobijeni kod pacijenata sa HOBP u odnosu na zdrave ispitanike, u vezi sa povećanim rizikom od egzacerbacije. Značajno je pomenuti da porast serumskog nivoa AAT može biti posledica komorbiditeta koji ima sličnu etiologiju kao HOBP, u smislu prisustva inflamacije, poput osteoporoze, ishemijske bolesti srca, metaboličkog sindroma itd. [161]. Iako u sprovedenoj studiji ovi podaci nisu bili dostupni za pacijente, korisno je znati da li su pacijenti u momentu uzorkovanja u akutnoj fazi inflamacije, bilo usled komorbiditeta ili egzacerbacije HOBP, s obzirom da povišen nivo AAT, kao posledica inflamacije, može da "maskira" inače sniženu vrednost AAT. Kao posledica toga, prisutna koncentracija AAT može biti blizu ili u okviru referentnog intervala, što otežava dijagnostiku AATD. Simultano određivanje ranog markera inflamacije, CRP-a omogućilo bi da se isključi trenutna inflamacija kao uzrok povećanja vrednosti AAT u cirkulaciji [162].

Za normalno funkcionisanje pluća neophodno je da postoji ravnoteža između proteaza i antiproteaza. Ukoliko je ovaj odnos narušen u korist proteaza, dolazi do narušavanja normalne funkcije pluća i oštećenja plućnog parenhima, koje za posledicu može imati pojavu HOBP, emfizema, bronhijalnu

astmu i bronhiektazije. Prvu liniju odbrane pluća od štetnog dejstava dima cigareta, mikrobioloških patogena i štetnih čestica iz spoljne sredine predstavljaju neutrofili [163]. Štetni agensi iz spoljašne sredine aktiviraju epitelne ćelije i makrofage da oslobađaju hemotaksične faktore, koji dalje utiču na preusmeravanje neutrofila i CD8⁺ ćelija iz cirkulacije. Oslobođena elastaza iz aktiviranih neutrofila deluje destruktivno na parenhim pluća, usled disbalansa ravnoteže proteaze/antiproteze i dovodi do oslobađanja inflamatornih medijatora. Oslobođene komponente dalje dovode do destrukcije alveolarnog zida, utiču na povećanu sekreciju mukusa i usporavaju reparaciju oštećenja nastalih dejstvom proteaza [164]. U salivi pacijenata sa HOBP utvrđeno je povišeno prisustvo neutrofilne elastaze, koja je bila dodatno dobar pokazatelj egzacerbacije, pored CRP-a i prokalcitonina [165]. Pacijenti sa HOBP su pokazali povišen nivo neutrofilne elastaze u uzorku plazme, u odnosu na zdrave, u istraživanju koje su sprovedli Sng i saradnici [166]. Kako je AAT protein koji inhibira neutrofilnu elastazu, kod HOBP-pacijenata serumski nivo kompleksa AAT-elastaza raste. Pokazan je povišen nivo ovog kompleksa je dobijen značajno povišen kod pacijenta sa sepsom koji su imali smrtni ishod u odnosu na preživeli [167]. Analizirani parametri u našoj studiji, koji se odnose na procenu aktivnosti AAT da inhibira neutrofilnu elastazu su SIA-elastaza i antielastazna aktivnost. Očekivano, vrednost SIA-elastaze bila je značajno niža kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, dok je antielastazna aktivnost takođe bila niža, ali bez statističke značajnosti (Tabela 10.). Pored toga, vrednosti za SIA-tripsin i antitripsinsku aktivnost, parametre koji takođe pokazuju aktivnost AAT da inhibira tripsin, bile su takođe značajno niže u grupi pacijenata u odnosu na zdrave (Tabela 10.). Na osnovu ovih rezultata, evidentno je da postoji narušena ravnoteža između proteaza i AAT, čija je posledica neadekvatna antielastazna zaštita, povezana sa pojavom HOBP. Usled nastalog disbalansa, moglo bi da dođe do pokretanja inflamatornog procesa i napredovanja opstrukcije u disajnim putevima.

U ovoj studiji je potvrđeno da se nivo oksidacije AAT odražava na njegovu funkcionalnu aktivnost (Tabela 11.). Povećanje nivoa oksidacije AAT uslovljava njegovu smanjenu sposobnost da inhibira elastazu, što potvrđuje dobijena negativna korelacije između nivoa oksidovanog AAT (g/L) i SIA-elastaze. Istovremeno, parametri funkcionalne aktivnosti AAT, antielastazna aktivnost, antitripsinska aktivnost, SIA-elastaza i SIA-tripsin pokazuju međusobno pozitivne korelacije u obe ispitivane grupe. Ovaj rezultat je očekivan, što potencijalno ima značaja u primeni ovih biomarkera za procenu antiproteazne zaštite pluća.

Pušenje se smatra primarnim faktorom rizika pojave HOBP. Prema literaturnim podacima, samo 20-30% pušača oboli od ove bolesti, međutim čak 80-90% pacijenata od ukupnog broja obolelih od HOBP su pušači [60, 168]. Pušenje uzrokuje mnogobojne promene u plućima, uključujući oštećenja malih disajnih puteva i alveolarne strukture, koje se reflektuju na funkcije perifernih disajnih puteva, posebno na zarobljavanje vazduha i smanjen kapacitet razmene gasova [169]. Uticaj pušenja na nivo oksidacije AAT, kao vodećeg spoljašnjeg faktora rizika za pojavu HOBP, potvrđen je u našem istraživanju na osnovu značajno povećanog nivoa oksidacije AAT kod pacijenata pušača u odnosu na pacijente nepušače. U našoj studiji je dobijen značajno viši nivo oksidovanog AAT kod pacijenata pušača u odnosu na zdrave pušače, što se može objasniti interakcijom pušenja i verovatnim prisustvom faktora inflamacije, na povećanje oksidativne modifikacije AAT (Tabela 12., Slika 10.). Ovakvi rezultati pojašnjavaju uticaj oksidativnog stresa, indukovanog pušenjem na patogenezu HOBP, a sa druge strane ukazuju na značaj uvođenja oksidovanog AAT kao biomarkera u kliničku praksu, kako bi se procenio rizik od nastanka HOBP. Pojedine studije ukazuju na imunomodulatornu ulogu oksidovanog AAT. Tako su Moraga i saradnici [149] u svojoj studiji dokazali sposobnost oksidovanog AAT da aktivira monocite. Možemo zaključiti da iako serumski nivo AAT jeste povećan kod pacijenata sa HOBP, njegova funkcionalna aktivnost da štiti respiratorni trakt od proteolitičke aktivnosti neutrofilne elastaze može biti oslabljena, što ograničava primenu nivoa AAT u serumu u proceni zaštite pluća. U ovome je i dodatni značaj rezultata o oksidovanom AAT koji bi možda bio bolji pokazatelj u kliničkoj praksi nego sam nivo AAT.

Glavna meta delovanja oksidanasa iz aktiviranih antiinflamatornih ćelija i komponenti duvanskog dima u strukturi AAT je aktivni centar sa aminokiselinskim ostatkom metionina na poziciji 358 (Met³⁵⁸). Oksidacijom ovog metionina nastaje proizvod metionin sulfoksid, koji ima za posledicu opadanje konstante asocijacije drugog reda vezivanja neutrofilne elastaze za AAT. Kao posledica ove promene u strukturi AAT, opada antielastazna aktivnost AAT, što može uticati na progresiju HOBP [99, 170]. U jednoj od ranijih studija je dokazana inaktivacija AAT u plućima pacova nakon izlaganja dimu cigareta, koji sadrži brojne prooksidanse [171].

Funkcionalni kapacitet AAT u velikoj meri zavisi od oksidativne inaktivacije njegovog aktivnog centra. U jednoj od ranijih studija, u kojoj je sprovedeno ispitivanje *in vitro*, proučavan je uticaj komponenti iz cigareta na aktivnost elastaze. [172]. Rezultati su pokazali da kapacitet AAT iz humanog seruma da inhibira elastazu (EIC) značajno opada dodavanjem vodenog rastvora komponenti dima cigareta. Očekivano, u našem istraživanju dobijene su značajno niže vrednosti parametara funkcionalne aktivnosti AAT, SIA-elastaze i SIA-tripsina, kod pacijenata pušača u odnosu na nepušače (Tabela 12., Slika 10.). Carp i saradnici [173] su pokazali prisustvo metionin-sulfoksida u lavaži pluća pušača, dok kod nepušača nije bio identifikovan. Istoimena studija je pokazala opadanje elastaza inhibitornog kapaciteta AAT u lavaži pluća pacijenata koji su pušači, za razliku od nepušača. Kao dva osnovna uzroka oksidacije metionina u strukturi AAT, u ovoj studiji se navode slobodni radikali poreklom iz udahnutog duvanskog dima, kao i slobodni radikali oslobođeni usled aktivnosti plućnih makrofaga. Kao posledica tretiranja esperimentalnih životinja hemijskim oksidansima, dolazi do smanjenja aktivnosti AAT i propadanja zida alveola, što vodi ranoj pojavi emfizema [174]. Naše istraživanje je pokazalo niže vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina kod pacijenata pušača u odnosu na kontrolnu grupu pušača, dok je nivo ukupnog AAT i oksidovanog AAT (g/L) bio značajno viši. Ovo je u skladu sa pretpostavkom iz gore navedene studije, da uticaj na nivo oksidacije AAT, a samim tim i njegovu funkcionalnost, potiče sa jedne strane od oksidanata iz duvanskog dima, a sa druge od aktiviranih faktora inflamacije. U jednoj od studija koja je ispitivala makrofage donjeg dela respiratornog trakta kod pušača, utvrđeno je da ove ćelije oslobađaju dovoljnu količinu oksidanata koji mogu da modulišu inhibitornu aktivnost AAT prema neutrofilnoj elastazi [175]. Aktivirane makrofage na taj način doprinose formiranju regija u donjem delu respiratornog trakta koje su, zbog oksidacije AAT, posebno osetljive na dejstvo elastaze oslobođene iz neutrofila i/ili makrofaga. U istraživanju koje je sproveo Mohsenin [176] zaključeno je da izlaganje oksidansima iz pušačkog dima, poput NO₂, dovodi do opadanja EIC u alveolarnoj tečnosti u donjem delu respiratornog trakta, odnosno sposobnosti AAT da inhibira serin proteze, koja se može poboljšati usled primene antioksidanata, vitamina C i E.

Analiza u kojoj su pacijenti bili podeljeni u tri kategorije prema pušačkom statusu, pokazala je da su bivši pušači u povoljnijoj situaciji u smislu aktivnosti AAT, obzirom da su SIA-elastaza i SIA-tripsin bili viši kod bivših u odnosu na trenutne pušače (Tabela 13.). Iako nije bilo poznato koliko je vremena prošlo od prestanaka korišćenja cigareta, značajno niža vrednost oksidovanog AAT (g/L) može da ukazuje na značaj prekida pušenja i uklanjanja štetnih efekata komponenti duvanskog dima na zaštitu AAT od oksidacije. U prilog ovome je i rezultat da su kod HOBP pacijenata vrednosti oksidovanog AAT kod bivših pušača bile približne vrednostima dobijenim kod nepušača (Tabela 13.). Studija Mannino i saradnika pokazala je opadanje plućne funkcije brže kod pušača nego kod bivših pušača, u periodu praćenja od tri godine [177]. Takođe, u istoj studiji pokazano je da je rizik od opadanja funkcije pluća kod bivših pušača jednak onom koji je dobijen kod ispitanika koji nikada nisu pušili. Svakako, za bolje sagledavanje uticaja prekida pušenja i procenjivanje vremenskog perioda koji je potreban za obnavljanje funkcionalne aktivnosti AAT, neophodno je kontrolisano praćenje pacijenata nakon prekida pušenja kroz definisan vremenski period.

Prema preporuci GOLD vodiča, klasifikacija pacijenata prema težini HOBP, utvrđuje se na osnovu vrednosti FEV₁. Obzirom na ograničeni broj ispitanika, u ovoj studiji svi HOBP pacijenti podeljeni su u dve grupe na osnovu težine bolesti, grupu sa blažim (GOLD2) i težim oblikom bolesti

(GOLD3+4). Očekivano, svi određivani parametri plućne funkcije, FVC, FEV1 i indeks FEV1/FVC, bili su značajno niži kod pacijenata sa težim (GOLD3+4) u odnosu na pacijente sa lakšim oblikom bolesti (GOLD2) (Tabela 15.).

Naše ispitivanje pokazalo je trend opadanja vrednosti parametara funkcionalne aktivnosti AAT, SIA-elastaze, SIA-tripsina, antielastazne i antitripsinske aktivnosti kod grupe sa težim u odnosu na grupu sa lakšim oblikom bolesti, ali bez statističke značajnosti (Tabela 15.). Teži oblik bolesti, svakako je praćen uznapredovalom inflamacijom i smanjenjem kapaciteta antioksidativne zaštite, što utiče na povećanje oksidacije AAT, ali dalje istraživanje trebalo bi da obuhvati veći broj pacijenata.

Ranijih godina se smatralo da je HOBP više zastupljena kod muškaraca [178]. Novija istraživanja pokazuju da su žene u većoj meri osetljive na pojavu HOBP od muškaraca, posebno kada su u pitanju pušači [179, 180, 181]. Prema istraživanjima sprovedenim u SAD, smrtnost kod žena od posledica HOBP u odnosu na muškarce je u porastu [182]. Pojedina istraživanja su pokazala da je veličina lumena, kao i debljina zidova malih disajnih puteva manja kod ženskog u odnosu na muški pol, što dovodi do lakše opstrukcije usled nagomilavanja štetnih komponenti iz dima cigarete [183]. Meta analiza rezultata 11 studija, pokazala je da kod žena brže dolazi do opadanja vrednosti FEV1 na godišnjem nivou u odnosu na muškarce, čak i u slučaju da muškarci konzumiraju više cigareta [179]. Smatra se da kod žena drugačiji metabolizam toksičnih materija iz duvanskog dima doprinosi razlici u sklonosti prema razvoju HOBP [184]. Pojedina istraživanja pokazuju veću aktivnost CYP-zavisnih enzima kod ženskog u odnosu na muški pol [185, 186]. Kako se aromatični policiklični ugljovodonici poreklom iz cigareta, brzo apsorbuju i metabolišu u veoma štetne metabolite kroz reakcije oksidacije, pomoću CYP450 i konjugacije, pomoću aldehid-oksidaze, ovaj proces je intenzivniji kod ženskog pola [187]. Takođe, uticaj estrogena na povećanje oksidativnog stresa, dodatno pojašnjava veću sklonost žena prema pojavi bolesti pluća, u odnosu na muškarce [188]. Utvrđeno je da estrogen dovodi do povećanog stvaranja toksičnih metabolita iz pušačkog dima, aktivacijom enzima CYP450. Kako estrogen nema sposobnost aktivacije sistema za neutralizaciju oksidansa, dolazi do disbalansa u korist oksidansa u odnosu na antioksidanse. Na ovaj način se povećava sklonost ka oksidativnom stresu kod žena, usled izloženosti duvanskom dimu i drugim štetnim agensima iz spoljašnje sredine. Dobijeni rezultati ovog istraživanja u grupi pacijenata pokazuju niže vrednosti FEV1/FVC indeksa kod muškaraca u odnosu na žene, sa graničnom značajnosti. Naša studija je pokazala da su u grupi HOBP-pacijenata muškarci pušači imali nižu vrednost SIA-tripsina u odnosu na žene pušače (Tabela 14., Slika 12.), dok je u grupi HOBP pacijenata nepušača pokazano da su muškarci imali značajno niži indeks FEV1/FVC u odnosu na žene. Opadanje FEV1 kod muškaraca sa HOBP pokazano je u jednoj studiji, gde se ujedno opadanje plućne funkcije dovodi u vezu sa povećanjem broja cigareta koji se konzumira i sa gojaznošću [189].

5.2 Značaj polimorfizma AAT i interakcije sa sredinskim faktorima u nastanku i razvoju HOBP

Značajan deo ove studije je analiza fenotipa AAT kod pacijenata sa HOBP i zdravih ispitanika. Gen za AAT je visoko polimorfan, što za posledicu ima preko 120 poznatih varijanti ovog proteina [102]. Za samo mali broj varijanti proteina, oko 20, dokazano je da su klinički značajne [190]. Laurell i Eriksson su prvi opisali deficijenciju AAT 1963. godine [69]. Deficijencija AAT je jedan od najčešćih naslednih poremećaja koji se prenosi kodominantno. Urođeni nedostatak AAT predstavlja predispoziciju za pojavu brojnih bolesti, prvenstveno bolesti jetre kod dece i odraslih, kao i bolesti pluća [191, 192]. Odsustvo simptoma bolesti često je uzrok kasnog dijagnostikovanja deficijencije alfa-1-antitripsina [193]. Teška deficijencija AAT praćena je pojavom simptoma, usled čega su prepoznavanje i blagovremeno dijagnostikovanje verovatniji. Nasuprot tome, blaži oblik deficijencije praćen je blagim simptomima, ili je bez simptoma, usled čega najčešće ostaje nedetektovan [114]. Ovo uzrokuje odlaganje započinjanja adekvatne terapije, pri čemu dolazi do pogoršanja simptoma.

Supstitucionna terapija kod deficita AAT je intravenska primena AAT poreklom iz humane plazme. Tri najčešća oblika prečišćenog humanog AAT su: Zemaira® (CSL Behring), Prolastin® (Talecris BioTherapeutics) i Aralast (Baxter) [194]. Kod veoma teške deficijencije AAT primenjuje se transplantacija pluća, a kod terminalnog oblika plućne bolesti definitivni izbor je transplantacija jetre, čime bi se obezbedila sinteza AAT [195]. Najčešće deficijentne varijante alfa-1-antitripsina su PiS i PiZ. Ostale deficijentne varijante, koje imaju nisku učestalost u opštoj populaciji, nazivaju se retkim deficijentnim varijantama, a uzrok su svega 2-4 % slučajeva deficijencije AAT. Istraživanje koje je obuhvatilo brojne kohort studije [196] navodi podatke za učestalost Z i S alela, između ostalog, za Severnu Makedoniju (redom, 0,8%, 1,3%), potom Rusiju (redom, 0,3%, 0,6%), Poljsku (redom, 1,3%, 1,4%) koje su slične dobijenim frekvencijama za zdrave učesnike iz naše studije (Z alel 1,6%, S alel 0,8%). Epidemiološka studija [197] koja je obuhvatila 11648 ispitanika sa simptomima astme, HOBP i emfizema, starosti od 18 do 70 godina, sa područja centralne i istočne Evrope, pokazala je učestalost koncentracije AAT ispod cut-off vrednosti (1,04 g/L) od 12,3%. U istoj studiji, među osobama sa koncentracijom AAT ispod cut-off vrednosti, učestalost Z alela je bila 13,6%, dok je učestalost S alela bila 5,1%. U našoj studiji u grupi HOBP pacijenata, nosioci Z i S alela bili su zastupljeni 3,6%, odnosno 1,9% (Tabela 16.). U studiji Jelić-Ivanović i saradnika [198], sprovedenoj u opštoj populaciji Srbije pre tri decenije, koja je obuhvatila 1060 ispitanika dobijena je učestalost Z alela od 1,3% i S alela 0,7%. Rezultati dobijeni u našoj studiji u kontrolnoj grupi su u skladu sa rezultatima ove studije, učestalost Z alela je bila 1,6% i S alela 0,8%. U našoj studiji nisu detektovani pacijenti nosioci Z homozigotnog fenotipa, za razliku od studije Topić i saradnika [199], sprovedene u populaciji Srbije gde je dobijena učestalost Z homozigota 2,9% kod HOBP pacijenta. Uzrok ovoj razlici može biti broj pacijenata sa HOBP, koji je u našoj studiji iznosio je 155, dok je u navedenoj studiji bilo 348 pacijenata sa HOBP. Takođe, učestalost MZ heterozigota kod pacijenata u našem istraživanju je 6,1%, dok je navedenoj studiji kod HOBP-pacijenata dobijeno 8,3%. Kod zdravih, u navedenom istraživanju frekvencija MZ heterozigota je bila 2,6%, što je vrlo slično rezultatu dobijenom u našoj studiji, 3,0%. Takođe, učestalost MZ heterozigota kod HOBP pacijenata u našoj studiji, bila je u skladu sa učestalošću dobijenoj danskoj studiji, gde je iznosila 6,3% [200]. Naša studija pokazuje da su u kontrolnoj grupi, kao i u grupi pacijenata frekvence analiziranih fenotipova odstupale su od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Do ovakvog ishoda može doći usled više različitih populacionih faktora [201], dobijanje potomstva u populaciji bliske srodnosti, male veličine populacije, kao i efekta "uskog grla" u populaciji, koji nastaje usled naglog pada populacije, što uslovljava smanjenje diverziteta. U našoj studiji odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi je posledica značajno veće učestalosti M3 homozigota od očekivane, a u grupi HOBP pacijenata dobijena je veća učestalost M2Z heterozigota u odnosu na očekivanu. U prethodno pomenutoj studiji Jelić-Ivanović i saradnika [198] sprovedenoj u opštoj populaciji Srbije, takođe je dobijeno odstupanje od H-W ravnoteže, usled veće učestalosti M1, M2 i M3 homozigota i manje učestalosti M1M2 i M1M3 heterozigota od očekivanih. Rezultati naše studije su delimično u saglasnosti sa ovom studijom, u pogledu uzroka odstupanja od H-W ravnoteže, a to je veća učestalost M3 homozigota, od očekivane.

U našoj studiji je u grupi pacijenata kod dva ispitanika detektovano je prisustvo disfunkcionalne varijante AAT, F varijante, sa učestalošću od 0,6 % (Tabela 16.). Kod oba pacijenta u našoj studiji detektovan je MF heterozigotni oblik. U studiji sprovedenoj u Srbiji 2012. godine kod zdravih ispitanika i pacijenata sa HOBP nije utvrđeno prisustvo F alela [199]. Slično našim rezultatima, u prethodno pomenutoj studiji u populaciji Srbije [198], u ispitivanom uzorku odraslih osoba detektovan je F alel sa frekvencom od 0,3%.

Učestalost alela i fenotipova dobijena u našoj studiji nije se razlikovala između pacijenata i kontrolne grupe (Tabela 16). Međutim, kada je ispitana razlika između deficijentnih i nedeficijentnih AAT fenotipova, primenom Fisher exact testa utvrđeno je da su deficijentni fenotipovi AAT bili učestaliji kod HOBP pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (10,4% i 4,8%, redom; $p=0,041$) (Tabela 17. i

Slika 14.). Naš rezultat je u skladu sa rezultatima dobijenim u napred pomenutoj studiji Topić i saradnika [199], gde takođe dobijena značajno veća učestalost deficijernih fenotipova (ZZ, MZ, SZ) kod HOBP pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (8,1% i 3,9 redom; $p < 0,001$). U jednoj od preglednih studija koja je obuhvatila analizu podataka 356 kohort studija iz 11 različitih geografskih regiona širom sveta, prikazane su frekvence M, S i Z alela, kao i ukupan broj individua, nosilaca svakog od šest glavnih genotipova (MM, MS, MZ, SS, SZ i ZZ). Između ostalog, podaci iz navedene studije pokazuju učestalost S alela na području centralne Evrope (1,92%), zapadne Evrope (4,5%) i južne Evrope (5,6%) [202]. Vrednosti frekvenci za S alel dobijene u našoj studiji kod HOBP pacijenata od 1,9% i kod zdravih 0,8%, najpribližnije su frekvencama dobijenim za centralnu Evropu. Takođe, podaci iz našeg istraživanja, gde je učestalost Z alela kod zdravih 1,6%, poklapaju se sa rezultatima za oblast južne i zapadne Evrope iz prethodno navedene studije, redom 1,25 i 1,28%. Druga studija, gde je prikazana učestalost i broj PiMZ heterozigota, na osnovu istraživanja sprovedenih u 74 zemalja sveta, pokazuje da tridesetpet miliona ljudi iz 74 zemalja nosi MZ genotip. U navedenoj studiji, prikazana učestalost MZ heterozigota u Evropi je 1:58. U severnoj Evropi MZ je zastupljen 4,1%, u zapadnoj 1,9%, centralnoj 1,1%, južnoj 2,4% i u istočnoj 1,4%, dok je u našem istraživanju ovaj fenotip bio zastupljen 3,0% kod zdravih, najsličniji vrednosti za južnu Evropu [203]. Ukoliko podelimo ispitanike na nosioce normalnih fenotipova (MM) i mutiranih (MF, MS, MZ, SZ), studija je pokazala da je učestalost mutiranih fenotipova bila značajno veća kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (11,7% i 4,8%, redom) (Tabela 18., Slika 15).

Ispitivanje razlike nivoa AAT u serumu zdravih i pacijenata sprovedeno je posebno u grupi nosilaca deficijernih i posebno u grupi nosilaca nedeficijernih fenotipova AAT i rezultati su predstavljeni u Tabeli 19. Naša studija je pokazala da su vrednosti serumskog nivoa AAT značajno viši kod pacijenata nego zdravih u grupi nosilaca nedeficijernih fenotipova. S obzirom da je AAT reaktant akutne faze, očekivane su više vrednosti u grupi pacijenata, ali je naša studija pokazala da kod ispitanika sa deficijnim fenotipovima ova razlika nije statistički dokazana, iako je postojao sličan trend, kao i kod ispitanika sa nedeficijnim fenotipovima. Svakako, povećanje koncentracije AAT, kao reaktanta akutne faze, otežava prepoznavanje nosioca deficijernih fenotipova, što je potvrđeno i u našem istraživanju, gde je serumski nivo AAT bio u referentnom opsegu (od 1,2 do 2,0 g/L). Rezultati ovog istraživanja su pokazali značajnu razliku u serumskoj koncentraciji AAT između ispitanika sa deficijnim i nedeficijnim fenotipom kod zdravih, gde su očekivano vrednosti bile više kod nosilaca nedeficijernih fenotipova. Takođe, nivo AAT bio je značajno niži kod pacijenata sa deficijnim u odnosu na one sa nedeficijnim fenotipovima, što je u skladu sa dosadašnjim podacima da nosioci deficijernih fenotipova imaju smanjenu koncentraciju ovog proteina. Ova studija potvrđuje da pacijenti sa deficijnim fenotipovima, obzirom na nižu koncentraciju AAT, imaju veći rizik za pojavu HOBP (Tabela 19.). Kod pacijenata koji imaju bolest jetre, kod nosilaca MZ i MS alela utvrđena je značajno niža koncentracija AAT u odnosu na nosioce MM homozigotnog fenotipa [204].

U Tabeli 19. prikazani su rezultati koji pokazuju da kod ispitanika koji imaju nedeficijentne fenotipove postoji značajno slabija funkcionalna aktivnost i značajno viši nivo oksidacije AAT kod pacijenata nego kod zdravih. Dok je u grupi ispitanika sa deficijnim fenotipovima bilo značajne razlike u funkcionalnoj aktivnosti, gde su SIA-elastaza (granična značajnost) i SIA-tripsina bile niže kod pacijenata u odnosu na zdrave, a oksidovani AAT viši. Ovo potvrđuje činjenicu, da iako je viši nivo AAT kao reaktanta akutne faze kod pacijenata, prisustvo oksidanasa poreklom iz aktiviranih ćelija uključenih u inflamatorni proces i proteaza iz aktiviranih neutrofila, dovodi do povećane oksidacije aktivnog centra ovog proteina i smanjuje njegovu funkcionalnu antiproteaznu aktivnost, nezavisno da li su nosioci deficijernih ili nedeficijernih fenotipova. Na granici značajnosti je razlika u antitripsinskoj aktivnosti kod zdravih ispitanika, koja je očekivano niža kod deficijernih nego nedeficijernih. Isto tako, značajno niža antitripsinska aktivnost dobijena je kod pacijenata sa deficijnim u odnosu na one sa nedeficijnim fenotipovima. Pored toga, ostali određivani parametri funkcionalne aktivnosti alfa-1-antitripsina, antielastazna i antitripsinska aktivnost, bili su

niži kod pacijenata sa deficijntnim fenotipovima, ali bez značajnosti. Ovakvi rezultati ukazuju da je odbrana pluća od proteaznog dejstva elastaze slabija kod pacijenata sa deficijntnim fenotipom (MS, MZ, SZ) u odnosu na one sa nedeficijntnim (MM, MF), što omogućava brže napredovanje bolesti i lošu prognozu. Slično našim rezultatima, studija koja je istraživala rizik za HOBP kod nosilaca Z alela u odnosu na MM nosioce pokazala je da nosioci Z alela imaju smanjenu plućnu funkciju i češće oboljevaju od emfizema u odnosu na MM nosioce [205]. Suprotno očekivanjima, naša studija je pokazala značajno nižu vrednost SIA-tripsina kod nedeficijntnih nego deficijntnih zdravih nosilaca. Kada smo pacijente podelili na nosioce normalnog fenotipa (MM) i one sa mutiranim (MF, MS, MZ, SZ), rezultati očekivano pokazuju značajno niže vrednosti serumskog nivoa AAT kod prisustva mutiranih genotipova (Tabela 20.). Oslabljenu funkcionalnu aktivnost AAT pokazali su pacijenti sa mutiranim genotipovima, jer su imali značajno nižu antitripsinsku aktivnost u odnosu na nosioce normalnog fenotipa.

U našem istraživanju pokazano je da pacijenti nosioci deficijntnih fenotipova (MS, MZ, SZ) imaju smanjenu funkcionalnu aktivnost AAT ukoliko su pušači u odnosu na nepušače, obzirom na vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina (Tabela 23, Slika 17. a,b). Ovo navodi na zaključak da kod pacijenata sa deficijntnim AAT fenotipom pušenje predstavlja faktor rizika za pogoršanje odbrambene sposobnosti alfa-1-antitripsina od razornog dejstva proteaza u plućnom parenhimu, što vodi ka opadanju funkcije pluća i daljoj progresiji bolesti. Saglasno ovakvom zaključku, može se dodati činjenica da ovo istraživanje pokazuje da je, kako u grupi pacijenata, tako i u grupi zdravih učesnika studije, vrednost antielastazne aktivnosti značajno niža kod pušača nego nepušača, ukoliko su u pitanju nosioci MS, MZ i SZ fenotipova alfa-1-antitripsina. Ovakav nalaz dodatno potvrđuje prethodno naveden udruženi efekat pušenja i prisustva deficijntnih fenotipova na slabljenje antiproteazne zaštite plućnog parenhima. Mnogobrojne studije pokazale su slične rezultate, pri čemu je najviše proučavano prisustvo Z alela, kao najčešće zastupljenog deficijntnog alela u široj populaciji. Meta analiza koja je obuhvatila podatke iz 16 studija, potvrdila je da MZ nosioci imaju povišen rizik za HOBP, kao i da je pušenje bitan kofaktor za pojavu ove bolesti [206]. Naša studija je pokazala da nosioci deficijntnih alela koji su pušači, imaju smanjenu funkcionalnu aktivnost AAT u odnosu na nepušače, usled značajno niže antitripsinske aktivnosti (Tabela 21., Slika 16.f). Dobijeni rezultati pokazuju da je u grupi pacijenata nosilaca deficijntnih fenotipova dobijeno značajno povećan nivoa oksidovanog AAT (g/L) kod pušača u odnosu na nepušače.

Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da pacijenti pušači, nosioci deficijntnih fenotipova (MS, MZ, SZ), imaju smanjenu antielastaznu aktivnost AAT, što može dovesti do napredovanja bolesti.

Iako je očekivano da su parametri plućne funkcije bolji kod mlađih pacijenata koji su nosioci nedeficijntnih fenotipova AAT, naša studija je dala drugačije rezultate od očekivanih. Rezultati su pokazali da niže vrednosti FEV1 i indeksa FEV1/FVC imaju pacijenti sa MM i MF fenotipovima ukoliko su mlađi od 60 godina, u odnosu na starije (Tabela 22., Slika 17.). Dalje, pacijenti mlađi od 60 godina, imali su značajno niži odnos FEV1/FVC ukoliko su bili nosioci nedeficijntnih u odnosu na nosioce deficijntnih fenotipova AAT. Donekle možemo pretpostaviti da prisustvo jednog M alela, u fenotipu pacijenata može doprineti sporijem opadanju spirometrijskih parametara. Takođe, ovi rezultati ukazuju da funkcija pluća nije u direktnoj vezi sa deficijntnim fenotipovima AAT. Pored toga, moguće je da pacijenti koji su stariji od 60 godina primenjuju terapiju sa bronhodilatatornim dejstvom i na taj način parametri funkcije pluća ne pokazuju opadanje. Svakako, značajno bi bilo sprovesti dodatne studije u kojima bi bio poznat podatak o terapiji koju primenju pacijenti, i gde bi bio veći i ujednačen broj nosilaca fenotipova MS, MZ i SZ.

U većini studija, ispitivanjem funkcije pluća, zavisno od fenotipa AAT, dobijeno je da kod nosilaca deficijntnih fenotipova dolazi do opadanja spirometrijskih parametara (FEV1, FEV1, FEV1/FVC). Pokazano je da je opadanje funkcije pluća brže kod pacijenata sa HOBP koji su nepušači i nosioci

PiZZ fenotipa u poređenju sa onima bez deficijencije, koji su takođe nepušači [207]. Istraživanje sprovedeno u Australiji kod PiZZ nosilaca, pokazalo je je ubrzano opadanje FEV1 vrednosti, što je u vezi sa smanjenom funkcijom alfa-1-antitripsina [208]. Studija koja je obuhvatila praćenje promene FEV1 vrednosti kod PiZZ homozigota u periodu od minimum 8 godina, korišćenjem podataka iz španskog registra za AATD, pokazuje da su pušenje i pneumonija povezani sa bržim opadanjem FEV1 [209]. U studiji sprovedenoj tokom 6 godina utvrđeno je godišnje opadanje FEV1 za 20-40 mL više kod nosilaca MZ u odnosu na nosioce MM fenotipa, bez obzira na pušački staus [210]. U jednoj od studija u kojoj su praćeni rudari tokom 5 godina, MZ nosioci pokazali su veće opadanje indeksa FEV₁/FVC [211].

Deo ovog istraživanja se odnosio na utvrđivanje razlike u funkcionalnoj aktivnosti alfa-1-antitripsina zavisno od toga da li su ispitanici nosioci MM homozigoti (M1M1, M2M2, M3M3) ili hetozigoti (M1M2, M1M3, M2M3), kao i zavisno od pušačkog statusa (pušač, nepušač) (Tabela 23., Slika 18.). Rezultati su pokazali da pacijenti nepušači imaju značajno nižu antielastaznu i antitripsinsku aktivnost ukoliko su nosioci nekog homozigotnog u odnosu na heterozigotni fenotip, što može da ukazuje da su nosioci M homozigotnih fenotipova bili više osetljivi na oksidativno dejstvo komponenti iz duvanskog dima. Suprotno našim rezultatima, jedno od starijih, *in vitro* ispitivanja, pokazalo je veću osetljivost AAT na delovanje oksidanta 1,6-heksan diamina, kod nosilaca MM heterozigotnih fenotipova (M1M2, M1M3, M2M3 i M1S) u odnosu na homozigotne (M1M1, M2M2) [212].

5.3 Uticaj polimorfizma MSRA rs10903323 na pojavu HOBP

Deo ove studije obuhvatio je ispitivanje MSRA rs10903323 polimorfizma kod pacijenata sa HOBP i kod zdravih ispitanika. Prema trenutno dostupnim podacima, ispitivanje polimorfizma rs1093323 MSRA je prvi put sprovedeno u populaciji Srbije. Distribucija genotipova i alela MSRA rs1093323 dobijeni u populaciji zdravih ispitanika u Srbiji (AA 80,5 %, AG 18,0% i GG 1,5%, A alel 89,5% i G alel 10,5%) (Tabela 24.) slična je rezultatima dobijenim za evropsku populaciju (AA 78,3 %, AG 20,5 % i GG 1,2 %, A alel 88,12% i G alel 11,88%) [213]. Podaci, koji su do sad dostupni, pokazuju da postoji značajna varijacija u distribuciji MSRA rs1093323 genotipova između različitih populacija. Na primer, distribucija genotipova AA, AG i GG u Istočnoj Aziji je 15,1 %, 49,2 %, 35,7 %, dok je u populaciji Amerike 50,7 %, 32,0 % i 17,3 % [213]. Evidentne razlike u raspodeli genotipova između ispitanika obuhvaćenim u studijama sprovedenim na području Evrope i Azije, najverovatnija su posledica genetičke varijabilnosti kod različitih rasa. U kontrolnoj grupi, kao i u grupi pacijenata frekvence analiziranih genotipova nisu odstupale su od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Takođe, distribucija genskih varijanti (AA/AG+GG) i alela (A/G) kod MSRA rs10903323 polimorfizma nije se razlikovala između kontrolne grupe i grupe pacijenata (Tabela 24.).

Prema našim saznanjima, ovo je prva studija u kojoj je ispitivana povezanost između MSRA rs1093323 polimorfizma i HOBP. Sposobnost enzima MSRA da delimično redukuje oksidovani metionin u aktivnom centru AAT i na taj način utiče na očuvanje antielastazne aktivnosti [139], je bila osnovna pretpostavka za istraživanje polimorfizma MSRA u patologiji HOBP u našoj studiji. Na osnovu distribucije genotipova, koja se nije značajno razlikovala između HOBP pacijenata i kontrolne grupe, možemo pretpostaviti da samo prisustvo genotipa u kome je mutirani alel G (AG, GG), ne predstavlja direktnu vezu sa pojavom HOBP.

Genotip MSRA nije imao uticaja na ukupan serumski nivo AAT, koji je svakako bio značajno viši kod pacijenata (Tabela 25.). Takođe, SIA-elastaza i SIA-tripsin bili su značajno niži kod pacijenata, bez obzira na genotip. Genotip MSRA nije pokazao uticaj na antielastaznu i antitripsinsku aktivnost, jer nisu dobijene razlike između pacijenata i zdravih, kao ni zavisno od toga da li su nosioci AA ili AG+GG MSRA rs10903323 genotipa. Kako je prikazano u Tabeli 25., u okviru grupe nosilaca AA genotipa, pacijenti su imali značajno nižu vrednost antitripsinske aktivnosti u odnosu na zdrave

ispitanike. S druge strane, u grupi nosilaca AG+GG genotipa vrednost antitripsinske aktivnosti bila je niža kod pacijenata, ali bez statističke značajnosti. Svakako iz ovoga možemo pretpostaviti da ispitivani MSRA rs10903323 polimorfizam nema direktan uticaj na ispitivane parametre funkcionalne aktivnosti AAT. Pored toga, u pomenutoj tabeli uočava se da su vrednosti oksidovanog AAT (g/L i %), iako bez statističke značajnosti, bile više kod nosilaca AG+GG genotipa u odnosu na nosioce AA genotipa, i u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata.

U pogledu parametara funkcionalnosti pluća, nije dobijen značajan uticaj MSRA rs1093323 polimorfizma na FVC, FEV1 i FEV1/FVC u grupi pacijenata. Interesantno, uočeno je da sva tri spirometrijska parametra imaju nešto višu vrednost kod nosilaca AG genotipa.

S obzirom da MSRA sistem ima sposobnost da redukuje oksidovani metionin u strukturi AAT i da učestvuje u reparaciji ovog proteina, cilj ove studije je bio da se ispita povezanost prisustva MSRA rs10903323 polimorfizma i nivoa oksidacije AAT. Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 27. i na Slici 20., u grupi pušača, vrednosti za SIA-elastazu i SIA-tripsin bile su značajno niže kod pacijenata, dok su vrednosti oksidovanog AAT bile značajno više u odnosu na kontrolnu grupu, bez obzira da li su nosioci AA ili AA+AG MSRA genotipa, dok ova razlika nije uočena u grupi nepušača. Neočekivano, zdravi nepušači imali su značajno viši nivo oksidovanog AAT (%) u odnosu na pušače, u grupi nosilaca AA genotipa (Slika 20. d.), a mogući uzrok može biti prisustvo bivših pušača u grupi trenutnih nepušača, ili izloženost oksidativnim agensima iz spoljne sredine, o čemu nismo imali dostupne podatke. Naša studija je pokazala značajno povišen nivo oksidovanog AAT (%) kod pacijenata pušača nosilaca G alela, u odnosu na pacijente pušače nosioce AA. Takođe, u okviru grupe pacijenata koji su nosioci G alela, oni koji su bili pušači pokazali su značajno viši nivo oksidovanog AAT (%) u odnosu na nepušače. Takođe, vrednost oksidovanog AAT u g/L, bila je značajno veća kod pacijenata pušača nosilaca G alela u odnosu na pacijente nepušače nosioce G alela. Ovi rezultati ukazuju da je prisustvo G alela, udruženog sa pušenjem, faktor rizika za povećanje nivoa oksidacije AAT, kod HOBP pacijenata. Kako je oksidovan AAT neefikasan u inhibiciji neutrofilne elastaze i doprinosi razvoju HOBP, rezultati ove studije ukazuju da prisustvo G alela, kod pacijenata pušača, može doprineti bržem napredovanju bolesti i pojavi težeg oblika.

U ovoj studiji pokazan je povećan nivo oksidativno modifikovanog AAT (% i g/L) kod pacijenata pušača koji su imali težak i veoma težak oblik bolesti (GOLD 3+4), a nosioci su G alela u odnosu na nosioce AA homozigotnog genotipa (Slika 22.). Ovo ukazuje da su G alel i pušenje faktori rizika za progresiju HOBP i nastanak teškog i vrlo teškog oblika, obzirom da usled delovanja komponenti dima cigarete dolazi do povećane oksidacije AAT, a da G alel verovatno ima smanjenu efikasnost redukcije AAT. S toga, ova studija pokazuje da je G alel mogući uzrok neadekvatne reparacije AAT kod pušača, što rezultuje povećanjem oksidativno modifikovanog AAT.

Klinički značaj MSRA rs10903323 polimorfizma, prema dostupnim podacima, proučavan je u španskoj i kineskoj populaciji. U španskoj studiji, G alel je identifikovan kao faktor rizika za pojavu ishemijske bolesti srca kod pacijenata sa reumatidnim artritismom [145]. Takođe, studija Martin i saradnici je pokazala da je MSRA rs10903323 polimorfizam povezan sa povećanjem oksidativnog stresa i da je uključen u patogenezu reumatidnog artritisa [143]. Studija sprovedena u Kini pokazala je da MSRA rs10903323 AG genotip utiče na pojavu reumatoidnog artritisa, posebno kod starijih, CRP-pozitivnih pacijenata (vrednost $CRP \geq 10$ mg/L) [144]. Značajno povećan rizik za koronarnu bolest srca kod nosilaca GA genotipa u kineskoj populaciji potvrdila je studija koju su sveli Gu i saradnici [138]. Kako je MSRA rs10903323 G alel identifikovan kao faktor rizika za bolesti inflamatorne etiologije, kao što su reumatidni artritis i kardiovaskularna oboljenja, može se pretpostaviti potencijalna povezanost sa HOBP u kojoj inflamacija, takođe, doprinosi nastanku i progresiji. Kako aktivacija oksidantnih agenasa u procesu inflamacije, dovodi do povećane oksidacije proteina, od značaja je aktivnost sistema koji učestvuju u njihovoj redukciji. Naši rezultati potvrđuju

povezanost G alela sa povišenom oksidacijom AAT kod pušača, što ima za posledicu opadanje antioksidantne zaštite od prooksidanata iz pušačkog dima i oboljevanje od HOBP.

Ovo istraživanje je obuhvatilo ispitivanje razlike u spirometrijskim parametrima kod HOBP-pacijenata podeljenih prema polu, zavisno od genotipa MSRA i starosti. Dobijeni rezultati su pokazali da je prisustvo AG genotipa kod žena starijih od 60 godina povezano sa značajno sniženom vrednosti FVC u odnosu na mlađe od 60 godina i istog genotipa (Tabela 29., Slika 23.). Kako je oksidativni stres prisutan u mnogim bolestima vezanim za proces starenja, zahvaljujući reparacionoj sposobnosti MSR sistem ispoljava značajnu ulogu u usporavanja progresije bolesti [214]. Značaj MSR sistema u zaštiti od oksidativnih oštećenja kod bolesti vezanih za starenje, potvrđen je u više studija. Kantorow i saradnici [215] su dokazali da MSRA u očnom sočivu štiti ćelije i njene komponente od oksidacije metionina, dok "utišavanje" ovog gena povećava osetljivost na oštećenja usled oksidativnog stresa. Takođe, pokazano je da povećana oksidacije metionina do metionin sulfoksida u molekulu alfa-sinukleina u mozgu sprečava njegovu fibrilaciju, kod Parkinsonove bolesti [216]. S druge strane, rezultati naše studije pokazuju da su muškarci AA homozigoti mlađi od 60 godina imali niži FEV1 nego stariji od 60 godina, a kod žena je dobijen niži FVC kod nosilaca AA homozigota u odnosu na AG heterozigote. Kod nosilaca AA genotipa, indeks FEV1/FVC bio je značajno niži u grupi žena i u grupi muškaraca kod pacijenata mlađih od 60 godina u odnosu na starije. Prema dobijenim rezultatima (Tabela 30., Slika 24.), AA genotip mogao bi da bude faktor rizika za opadanje plućne funkcije kod pacijenata mlađih od 60 godina. Prisustvo AA genotipa je takođe, u vezi sa sniženim vrednostima parametara plućne funkcije kod pacijenata mlađih od 60 godina, i to FVC kod pušača, FEV1 i FEV1/FVC kod nepušača, u odnosu na starije od 60 godina. Većina dosadašnjih istraživanja kod pacijenata sa HOBP potvrđuje da funkcija pluća opada sa godinama. Primer su podaci studije koju su sprovedli Kim i saradnici, koja pokazuje da je kod starijih pacijenata godišnje opadanje FEV1 brže nego kod mlađih pacijenata [217]. Uticaj na parametre funkcije pluća kod HOBP pacijenata, kao posledica interakcije MSRA rs10903323 polimorfizma i pušenja nije pokazan u ovoj studiji (Slika 25.).

5.4 Udruženi uticaj polimorfizma MSRA rs10903323 i varijanti alfa-1-antitripsina na nastanak HOBP

U okviru ove studije ispitivan je uticaj interakcije MSRA rs10903323 genotipa i fenotipa alfa-1-antitripsina kod pacijenata sa HOBP, na spirometrijske parametre (Tabela 32.). Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje razlike, sa graničnom značajnosti, u vrednosti indeksa FEV1/FVC, koji je kod pacijenata sa deficitarnim fenotipom (MS, MZ, SZ) bio niži ukoliko su bili nosioci AG u odnosu na AA genotip (Slika 26. c.). Dobijeni rezultat može biti posledica istovremeno smanjene koncentracije AAT, koja za posledicu ima oslabljenu zaštitu pluća i veću osetljivost na proteolitičko dejstvo elastaze. Sa druge strane, bilo bi od značaja ispitati ulogu MSRA rs10903323 polimorfizma na količinu MSRA ili stabilnost iRNK u *in vitro* studijama. Iz ovoga možemo zaključiti, da istovremeno prisustvo deficitarnog fenotipa alfa-1-antitripsina i mutiranog G alela u genotipu MSRA, može potencijalno predstavljati rizik za pogoršanje plućne funkcije kod pacijenata sa HOBP. Kako je ovo prva studija, koja proučava povezanost MSRA rs10903323 polimorfizma i pojave HOBP, potrebna su dodatna ispitivanja na većem broju ispitanika, kako bi se potvrdili rezultati dobijeni u našoj studiji.

5.5 Nezavisni prediktori za pojavu HOBP

Korišćenjem binarnog logističkog modela ispitivani su prediktori za pojavu HOBP (Tabela 33.). U ovoj studiji dobijeno je da su snižena vrednost SIA-elastaze, povišen nivo oksidovanog AAT i starost veća od 60 godina nezavisni prediktori za pojavu HOBP. Pored toga u ovoj studiji je i pušenje je, očekivano, potvrđeno kao nezavistan prediktor za pojavu HOBP. Prethodno prikazani rezultati, koji

su potvrdili sniženu vrednost SIA elastaze i povišen nivo oksidacije kod pacijenata sa HOBP u odnosu na kontrolne ispitanike, u skladu su sa ovakvim nalazom. Takođe, deficijentni fenotipovi alfa-1-antitripsina, MS, MZ, SZ, identifikovani su kao nezavisni prediktori za pojavu ove bolesti, sa graničnom značajnosti. Kao što je do sada potvrđeno u brojnim istraživanjima, faktor rizika za pojavu emfizema je prisustvo deficijentnih varijanti AAT, čije prisustvo je praćeno smanjenom serumskom koncentracijom ovog proteina. Naši rezultati pokazuju da, iako je ukupna koncentracija AAT značajno viša kod učesnika sa HOBP nego zdravih, u samoj grupi pacijenata, značajno višu koncentraciju imali su nosioci nedeficijentnih nego deficijentnih fenotipova. Pušenje kao faktor rizika za poremećaj funkcije respiratornog sistema i pojavu HOBP potvrđen je i u studiji koju je sproveo Liu [218]. Rezultati naše studije ukazuju da poznavanje fenotipa AAT i određivanje nivoa oksidovanog AAT kod pušača starijih od 60 godina, može biti od značaja u identifikovanju povećanog rizika za pojavu HOBP.

Rezultati ove studije, u kojoj se po prvi put određuje povezanost MSRA rs10903323 polimorfizma i HOBP, identifikovan je G alel MSRA rs10903323 polimorfizma, koji udružen sa pušenjem, predstavlja faktor rizika za pojavu HOBP. Određivanje ovog polimorfizma, moglo bi da pomogne identifikaciji osoba sa povećanim rizikom za pojavu bolesti pluća, poput emfizema. Na ovaj način identifikovane osetljive osobe, mogle bi blagovremeno da budu usmerene na izbegavanje pušenja i izlaganju štetnih faktora okoline, u cilju prevencije bolesti pluća. Ograničenje ove studije je relativno mali broj ispitanika, zbog čega bi dodatna istraživanja na većem broju ispitanika bila od značaja. Takođe, detaljniji opis pacijenata, podaci o relevantnim biohemijskim parametrima (npr. CRP) i komorbiditetima bi doprineli poboljšanju relevantnosti dobijenih rezultata. Kako postoji nekoliko polimorfizama u MSRA genu, neki od njih bi mogli biti bitni za enzimsku aktivnost u pogledu efikasnosti reparacije oksidovanog AAT, pa bi proširenje studije za analizu celog gena mogle da se urade u budućnosti. Pored toga, ispitivanje aktivnosti MSRA, pogodnom metodom za merenje intracelularne aktivnosti, dalo bi dodatne informacije o njegovom značaju u odbrani AAT od oksidacije, ukoliko bi se dodatno potvrdio značaj MSRA i eventualno povezao sa određenim varijantama.

Ova studija je pokazala da serumski biomarkeri koji su relativno jeftini i jednostavni za određivanje, SIA-elastaza i oksidovani AAT, uz fenotipizaciju AAT mogu da unaprede postavljenje dijagnoze, praćenje i prevenciju HOBP u kliničkoj praksi. Takođe, oksidovani AAT bi mogao biti predložen kao prognostički biomarker za procenu štetnosti pušenja na pojavu i težinu HOBP. Istovremeno, mogao bi da bude koristan za praćenje delovanja antioksidativne terapije, kao dopunske terapije kod obolelih od hronične opstruktivne bolesti pluća.

6. Zaključci

1. Snižene vrednosti SIA-elastaze, SIA-tripsina i antitripsinske aktivnosti mogu da ukazuju na oslabljenu antiproteaznu zaštitu kod pacijenata sa HOBP.
2. Povišen nivo oksidovanog AAT (izražen u % i g/L) kod HOBP-pacijenata ukazuje na prisustvo oksidativnog stresa koji je uzrok oksidacije aktivnog centra AAT.
3. Snižene vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina, kao i povišen oksidovani AAT kod pacijenata pušača ukazuju da pušenje doprinosi značajnom oksidativnom oštećenju alfa-1-antitripsina.
4. Pacijenti sa težim oblikom bolesti (GOLD 3+4) u odnosu na one sa lakšim oblikom bolesti (GOLD 2) pokazuju tendenciju pada parametara funkcionalne aktivnosti alfa-1-antitripsina (SIA-elastaza, SIA-tripsin, antielastazna i antitripsinska aktivnost) i rasta nivoa oksidovanog alfa-1-antitripsina.
5. Značajno snižene vrednosti SIA-elastaze i SIA-tripsina kod pacijenata muškog pola koji su pušači u odnosu na nepušače ukazuje na udruženi efekat pola i pušenja na smanjenu funkcionalnu aktivnost AAT i veću sklonost pojavu HOBP.
6. Pozitivna korelacija između antielastazne aktivnosti i spirometrijskih parametara (FVC, FEV1) kod pacijenata nepušača ukazuje da slabljenje antielastazne zaštite pluća doprinosi opadanju funkcije pluća.
7. Distribucija fenotipova i alela alfa-1-antitripsina između kontrolne grupe i HOBP-pacijenata se ne razlikuje. U kontrolnoj grupi i u grupi HOBP-pacijenata postoji odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže.
8. Deficijentni fenotipovi (MS, MZ, SZ) značajno više su bili zastupljeni kod HOBP-pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu.
9. Mutirani fenotipovi AAT (MF, MS, MZ, SZ) značajno su više bili zastupljeni kod pacijenata sa HOBP nego kod zdravih ispitanika.
10. Parametri funkcionalne aktivnosti alfa-1-antitripsina (SIA-elastaza, SIA-tripsin i antitripsinska aktivnost) kod nosilaca deficijentnih fenotipova značajno su niži kod pacijenata u odnosu na zdrave, dok je nivo oksidovanog alfa-1-antitripsina značajno viši.
11. Pacijenti nepušači nosioci MM homozigotnog fenotipa alfa-1-antitripsina imaju sniženu antielastaznu i antitripsinsku aktivnost u odnosu na nosioce MM heterozigotnog fenotipa.
12. Distribucija genskih varijanti (AA/AG+GG) i alela (A/G) kod MSRA rs10903323 polimorfizma nije se razlikovala između kontrolne grupe i grupe pacijenata. Frekvence analiziranih genskih varijanti u kontroli i kod pacijenata bile su u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži.
13. Distribucija genskih varijanti (AA/AG+GG) MSRA rs10903323 polimorfizma je pokazala razliku između pacijenata podeljenih prema težini bolesti na lakši (GOLD 2) i teži oblik (GOLD 3+4), tako da je AA genotip više zastupljen kod GOLD3+4 stadijuma, u odnosu na AG+GG genotip.
14. Polimorfizam MSRA rs10903323 nije uticao na funkcionalnu aktivnost alfa-1-antitripsina u kontrolnoj grupi i kod HOBP-pacijenata.
15. Značajno povećanje oksidovanog AAT (%) kod pacijenata pušača sa AG MSRA rs10903323 genotipom u odnosu na pacijente pušače sa AA genotipom i porast oksidovanog AAT (g/L) kod pacijenta pušača sa AG genotipom u odnosu na pacijente nepušače sa AG genotipom ukazuje na udruženost G alela MSRA genotipa sa pušenjem koja doprinosi smanjenoj antioksidantnoj zaštiti alfa-1-antitripsina.
16. Polimorfizam MSRA rs10903323 ne utiče na funkcionalnu aktivnost AAT i nivo oksidovanog AAT kod HOBP-pacijenata u odnosu na težinu bolesti (GOLD2, GOLD 3+4).
17. Značajan genetički faktor rizika koji doprinosi opadanju plućne funkcije u mlađoj starosnoj dobi, nezavisno od pušačkog statusa i pola, bio je MSRA homozigot AA.
18. Godine starosti, pušenje, oksidovani alfa-1-antitripsin, deficijentni fenotipovi AAT i nivo SIA-elastaze predstavljaju nezavisne prediktore za pojavu HOBP.

7. Literatura

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, „Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2020 GOLD Report,“ 2020. [Na mreži]. Available: https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/12/GOLD-2020-FINAL-ver1.2-03Dec19_WMV.pdf. [Poslednji pristup 2 November 2020].
- [2] F. Mejza, L. Gnatiuc, A. S. Buist, W. M. Vollmer, B. Lamprecht, D. O. Obaseki, P. Nastalek, E. Nizankowska-Mogilnicka and P. G. J. Burney, "Prevalence and burden of chronic bronchitis symptoms: results from the BOLD study.," *The European respiratory journal*, vol. 50, no. 5, November 2017.
- [3] S. D. Shapiro, "The pathogenesis of emphysema: the elastase:antielastase hypothesis 30 years later.," *Proceedings of the Association of American Physicians*, vol. 107, no. 3, pp. 346-52, October 1995.
- [4] J. A. Guenette, K. A. Webb and D. E. O'Donnell, "Does dynamic hyperinflation contribute to dyspnoea during exercise in patients with COPD?," *The European respiratory journal*, vol. 40, no. 2, pp. 322-9, August 2012.
- [5] J. Vestbo, S. S. Hurd, A. G. Agustí, P. W. Jones, C. Vogelmeier, A. Anzueto, P. J. Barnes, L. M. Fabbri, F. J. Martinez, M. Nishimura, R. A. Stockley, D. D. Sin and R. Rodriguez-Roisin, "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 187, no. 4, pp. 347-65, February 2013.
- [6] World Health Organization, „Chronic obstructive pulmonary disease (COPD),“ 2023. [Na mreži]. Available: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)). [Poslednji pristup 15 July 2023].
- [7] Institut za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović Batut.”, „Zdravstveno-statistički godišnjak Republike Srbije,“ 2020. [Na mreži]. Available: www.batut.org.rs/download/publikacije/pub2020.pdf. [Poslednji pristup 3 December 2022].
- [8] P. G. J. Burney, J. Patel, R. Newson, C. Minelli and M. Naghavi, "Global and regional trends in COPD mortality, 1990-2010.," *The European respiratory journal*, vol. 45, no. 5, pp. 1239-47, May 2015.
- [9] B. R. Celli and W. MacNee, "Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper.," *The European respiratory journal*, vol. 23, no. 6, pp. 932-46, June 2004.
- [10] J. P. Allinson, R. Hardy, G. C. Donaldson, S. O. Shaheen, D. Kuh i J. A. Wedzicha, „The Presence of Chronic Mucus Hypersecretion across Adult Life in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development,“ *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, t. 193, p. 662–672, March 2016.

- [11] P.-R. Burgel i J. A. Nadel, „Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases,“ *European Respiratory Journal*, t. 32, p. 1068–1081, May 2008.
- [12] T. Seemungal, R. Harper-Owen, A. Bhowmik, I. Moric, G. Sanderson, S. Message, P. Maccallum, T. W. Meade, D. J. Jeffries, S. L. Johnston and J. A. Wedzicha, "Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 164, no. 9, pp. 1618-23, November 2001.
- [13] J. A. Wedzicha and T. A. R. Seemungal, "COPD exacerbations: defining their cause and prevention.," *Lancet (London, England)*, vol. 370, no. 9589, pp. 786-96, September 2007.
- [14] T. A. Seemungal, R. Harper-Owen, A. Bhowmik, D. J. Jeffries and J. A. Wedzicha, "Detection of rhinovirus in induced sputum at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.," *The European respiratory journal*, vol. 16, no. 4, pp. 677-83, October 2000.
- [15] M. Divo, C. Cote, J. P. de Torres, C. Casanova, J. M. Marin, V. Pinto-Plata, J. Zulueta, C. Cabrera, J. Zagaceta, G. Hunninghake and B. Celli, "Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 186, no. 2, pp. 155-61, July 2012.
- [16] N. Angelis, K. Porpodis, P. Zarogoulidis, D. Spyrtos, I. Kioumis, A. Papaiwannou, G. Pitsiou, K. Tsakiridis, A. Mpakas, S. Arikas, T. Tsiouda, N. Katsikogiannis, I. Kougioumtzi, N. Machairiotis, M. Argyriou, G. Kessisis and K. Zarogoulidis, "Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.," *Journal of thoracic disease*, vol. 6 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. S167-72, March 2014.
- [17] M. G. Cosio Piqueras and M. G. Cosio, "Disease of the airways in chronic obstructive pulmonary disease.," *The European respiratory journal. Supplement*, vol. 34, pp. 41s-49s, December 2001.
- [18] P. J. Barnes, "Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease.," *Clinics in chest medicine*, vol. 35, no. 1, pp. 71-86, March 2014.
- [19] P. Pahal, A. Avula i S. Sharma, „Emphysema,“ u *StatPearls*, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2021.
- [20] V. M. Keatings, P. D. Collins, D. M. Scott and P. J. Barnes, "Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 153, no. 2, pp. 530-4, February 1996.
- [21] M. C. Yeung and A. D. Buncio, "Leukocyte count, smoking, and lung function.," *The American journal of medicine*, vol. 76, no. 1, pp. 31-7, January 1984.
- [22] P. J. Barnes, "Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond the lungs.," *PLoS medicine*, vol. 7, no. 3, p. e1000220, March 2010.

- [23] P. J. Barnes, "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 8, no. 3, pp. 183-92, March 2008.
- [24] H. Hammad and B. N. Lambrecht, "Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation.," *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 118, no. 2, pp. 331-6, August 2006.
- [25] G. R. Van Pottelberge, K. R. Bracke, I. K. Demedts, K. De Rijck, S. M. Reinartz, C. M. van Drunen, G. M. Verleden, F. E. Vermassen, G. F. Joos and G. G. Brusselle, "Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD.," *Respiratory research*, vol. 11, no. 1, p. 35, March 2010.
- [26] M. Saetta, A. Di Stefano, G. Turato, F. M. Facchini, L. Corbino, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia and L. M. Fabbri, "CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 157, no. 3 Pt 1, pp. 822-6, March 1998.
- [27] J. Majo, H. Ghezzi and M. G. Cosio, "Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema.," *The European respiratory journal*, vol. 17, no. 5, pp. 946-53, May 2001.
- [28] G. Chrysofakis, N. Tzanakis, D. Kyriakoy, M. Tsooumakidou, I. Tsiligianni, M. Klimathianaki and N. M. Siafakas, "Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD.," *Chest*, vol. 125, no. 1, pp. 71-6, January 2004.
- [29] J. P. McAleer and J. K. Kolls, "Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense.," *Immunological reviews*, vol. 260, no. 1, pp. 129-44, July 2014.
- [30] S. F. van Eeden and D. D. Sin, "Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a lung and systemic process.," in *Canadian respiratory journal*, Egypt, 2013.
- [31] P. A. Kirkham and P. J. Barnes, "Oxidative stress in COPD.," *Chest*, vol. 144, no. 1, pp. 266-273, July 2013.
- [32] P. Montuschi, P. J. Barnes and L. J. 2. Roberts, "Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 18, no. 15, pp. 1791-800, December 2004.
- [33] E. Zinellu, A. Zinellu, A. G. Fois, C. Carru and P. Pirina, "Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review.," *Respiratory research*, vol. 17, no. 1, p. 150, November 2016.
- [34] E. R. Stadtman and R. L. Levine, "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.," *Amino acids*, vol. 25, no. 3-4, pp. 207-18, December 2003.
- [35] I. Rahman and I. M. Adcock, "Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD.," *The European respiratory journal*, vol. 28, no. 1, pp. 219-42, July 2006.

- [36] T. W. Kensler, N. Wakabayashi and S. Biswal, "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 47, pp. 89-116, 2007.
- [37] D. Malhotra, R. Thimmulappa, A. Navas-Acien, A. Sandford, M. Elliott, A. Singh, L. Chen, X. Zhuang, J. Hogg, P. Pare, R. M. Tudor and S. Biswal, "Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 178, no. 6, pp. 592-604, September 2008.
- [38] T. Harju, R. Kaarteenaho-Wiik, Y. Soini, R. Sormunen and V. L. Kinnula, "Diminished immunoreactivity of gamma-glutamylcysteine synthetase in the airways of smokers' lung.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 166, no. 5, pp. 754-9, September 2002.
- [39] K. M. Beeh, J. Beier, N. Koppenhoefer and R. Buhl, "Increased glutathione disulfide and nitrosothiols in sputum supernatant of patients with stable COPD.," *Chest*, vol. 126, no. 4, pp. 1116-22, October 2004.
- [40] C. Michaeloudes, M. B. Sukkar, N. M. Khorasani, P. K. Bhavsar and K. F. Chung, "TGF- β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells.," *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, vol. 300, no. 2, pp. L295-304, February 2011.
- [41] L. Milevoj Kopčinović, A.-M. Domijan, K. Posavac, I. Čepelak, T. Žanić Grubišić and L. Rumora, "Systemic redox imbalance in stable chronic obstructive pulmonary disease.," *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, vol. 21, no. 8, pp. 692-698, December 2016.
- [42] V. N. Ambade, A. N. Sontakke, M. S. Barthwal, R. Tyagi and D. R. Basannar, "Diagnostic Utility of Biomarkers in COPD.," *Respiratory care*, vol. 60, no. 12, pp. 1729-42, December 2015.
- [43] G. Caramori, I. M. Adcock, P. Casolari, K. Ito, E. Jazrawi, L. Tsaprouni, G. Villetti, M. Civelli, C. Carnini, K. F. Chung, P. J. Barnes and A. Papi, "Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer.," *Thorax*, vol. 66, no. 6, pp. 521-7, June 2011.
- [44] K. Ito and P. J. Barnes, "COPD as a disease of accelerated lung aging.," *Chest*, vol. 135, no. 1, pp. 173-180, January 2009.
- [45] F. Madeo, A. Zimmermann, M. C. Maiuri and G. Kroemer, "Essential role for autophagy in life span extension.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 125, no. 1, pp. 85-93, January 2015.
- [46] C.-A. Brandsma, M. Van den Berge, T.-L. Hackett, G. Brusselle and W. Timens, "Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine.," *The Journal of pathology*, vol. 250, no. 5, pp. 624-635, April 2020.
- [47] K. E. Paschalaki, R. D. Starke, Y. Hu, N. Mercado, A. Margariti, V. G. Gorgoulis, A. M. Randi and P. J. Barnes, "Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive

pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence.," *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 31, no. 12, pp. 2813-26, December 2013.

- [48] M. M. Monick, L. S. Powers, K. Walters, N. Lovan, M. Zhang, A. Gerke, S. Hansdottir and G. W. Hunninghake, "Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 185, no. 9, pp. 5425-35, November 2010.
- [49] K. Mizumura, S. M. Cloonan, J. A. Haspel and A. M. K. Choi, "The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases.," *Chest*, vol. 142, no. 5, pp. 1289-1299, November 2012.
- [50] A. S. Buist, M. A. McBurnie, W. M. Vollmer, S. Gillespie, P. Burney, D. M. Mannino, A. M. B. Menezes, S. D. Sullivan, T. A. Lee, K. B. Weiss, R. L. Jensen, G. B. Marks, A. Gulsvik and E. Nizankowska-Mogilnicka, "International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study.," *Lancet (London, England)*, vol. 370, no. 9589, pp. 741-50, September 2007.
- [51] Y. Fukuchi, M. Nishimura, M. Ichinose, M. Adachi, A. Nagai, T. Kuriyama, K. Takahashi, K. Nishimura, S. Ishioka, H. Aizawa and C. Zaher, "COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study.," *Respirology (Carlton, Vic.)*, vol. 9, no. 4, pp. 458-65, November 2004.
- [52] Y. Yang, W. Li, Y. Guo, Y. Liu, Q. Li, K. Yang, S. Wang, N. Zeng, W. Duan, Z. Chen, H. Chen, X. Li, W. Zhao, R. Chen and Y. Kang, "Early COPD Risk Decision for Adults Aged From 40 to 79 Years Based on Lung Radiomics Features.," *Frontiers in medicine*, vol. 9, p. 845286, 2022.
- [53] W. J. Kim i C. Y. Lee, „Environmental exposures and chronic obstructive pulmonary disease,“ *Molecular & Cellular Toxicology*, t. 13, p. 251–255, 2017.
- [54] A. Y. Leem, S. K. Kim, J. Chang, Y. A. Kang, Y. S. Kim, M. S. Park, S. Y. Kim, E. Y. Kim, K. S. Chung and J. Y. Jung, "Relationship between blood levels of heavy metals and lung function based on the Korean National Health and Nutrition Examination Survey IV-V.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 10, pp. 1559-70, 2015.
- [55] M. C. Turner, D. Krewski, Y. Chen, C. A. 3. Pope, S. M. Gapstur and M. J. Thun, "Radon and COPD mortality in the American Cancer Society Cohort.," *The European respiratory journal*, vol. 39, no. 5, pp. 1113-9, May 2012.
- [56] M. D. Eisner, N. Anthonisen, D. Coultas, N. Kuenzli, R. Perez-Padilla, D. Postma, I. Romieu, E. K. Silverman and J. R. Balmes, "An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 182, no. 5, pp. 693-718, September 2010.
- [57] J. Y. T. Po, J. M. FitzGerald and C. Carlsten, "Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and meta-analysis.," *Thorax*, vol. 66, no. 3, pp. 232-9, March 2011.
- [58] World Health Organization, „Tobacco,“ 31 July 2023. [Na mreži]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>. [Poslednji pristup 1 November 2023].

- [59] C. Feldman and R. Anderson, "Cigarette smoking and mechanisms of susceptibility to infections of the respiratory tract and other organ systems.," *The Journal of infection*, vol. 67, no. 3, pp. 169-84, September 2013.
- [60] M. Aghapour, P. Raei, S. J. Moghaddam, P. S. Hiemstra and I. H. Heijink, "Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Role of Cigarette Smoke Exposure.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 58, no. 2, pp. 157-169, February 2018.
- [61] M. R. Knowles and R. C. Boucher, "Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 109, no. 5, pp. 571-7, March 2002.
- [62] J. C. Hogg, "State of the art. Bronchiolitis in chronic obstructive pulmonary disease.," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 3, no. 6, pp. 489-93, August 2006.
- [63] K. Ito, M. Ito, W. M. Elliott, B. Cosio, G. Caramori, O. M. Kon, A. Barczyk, S. Hayashi, I. M. Adcock, J. C. Hogg and P. J. Barnes, "Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease.," *The New England journal of medicine*, vol. 352, no. 19, pp. 1967-76, May 2005.
- [64] M. D. Eisner, J. Balmes, P. P. Katz, L. Trupin, E. H. Yelin and P. D. Blanc, "Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease.," *Environmental health : a global access science source*, vol. 4, no. 1, p. 7, May 2005.
- [65] N. Putcha, R. G. Barr, M. K. Han, P. G. Woodruff, E. R. Bleeker, R. E. Kanner, F. J. Martinez, B. M. Smith, D. P. Tashkin, R. P. Bowler, M. D. Eisner, S. I. Rennard, R. A. Wise and N. N. Hansel, "Understanding the impact of second-hand smoke exposure on clinical outcomes in participants with COPD in the SPIROMICS cohort.," *Thorax*, vol. 71, pp. 411-420, 2016.
- [66] W. Hou, S. Hu, C. Li, H. Ma, Q. Wang, G. Meng, T. Guo and J. Zhang, "Cigarette Smoke Induced Lung Barrier Dysfunction, EMT, and Tissue Remodeling: A Possible Link between COPD and Lung Cancer.," *BioMed research international*, vol. 2019, p. 2025636, 2019.
- [67] R. Laniado-Laborín, "Smoking and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Parallel epidemics of the 21 century.," *International journal of environmental research and public health*, vol. 6, no. 1, pp. 209-24, January 2009.
- [68] J. A. Barberà, "Mechanisms of development of chronic obstructive pulmonary disease-associated pulmonary hypertension.," *Pulmonary circulation*, vol. 3, no. 1, pp. 160-4, January 2013.
- [69] C.-B. Laurell and S. Eriksson, "The electrophoretic α 1-globulin pattern of serum in α 1-antitrypsin deficiency.," *Scand J Clin Lab invest*, pp. 132-40, March 1963.
- [70] R. A. El-Zein, R. P. Young, R. J. Hopkins and C. J. Etzel, "Genetic predisposition to chronic obstructive pulmonary disease and/or lung cancer: important considerations when evaluating risk.," *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, vol. 5, no. 4, pp. 522-7, April 2012.
- [71] I. Blanco, I. Diego, P. Bueno, S. Pérez-Holanda, F. Casas-Maldonado and M. Miravittles, "Prevalence of α (1)-antitrypsin PiZZ genotypes in patients with COPD in Europe: a systematic review.," *European*

respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society, vol. 29, no. 157, September 2020.

- [72] J. A. Bornhorst, D. N. Greene, E. R. Ashwood and D. G. Grenache, " α 1-Antitrypsin phenotypes and associated serum protein concentrations in a large clinical population.," *Chest*, vol. 143, no. 4, pp. 1000-1008, April 2013.
- [73] M. Buraczynska, D. Schött, A. J. Hanzlik, B. Höltmann and W. T. Ulmer, "Alpha 1-antitrypsin gene polymorphism related to respiratory system disease.," *Klinische Wochenschrift*, vol. 65, no. 12, pp. 538-41, July 1987.
- [74] B. Lindmark, E. Svenonius and S. Eriksson, "Heterozygous alpha 1-antichymotrypsin and PiZ alpha 1-antitrypsin deficiency. Prevalence and clinical spectrum in asthmatic children.," *Allergy*, vol. 45, no. 3, pp. 197-203, April 1990.
- [75] W. Poller, J. P. Faber, S. Weidinger, K. Tief, S. Scholz, M. Fischer, K. Olek, M. Kirchgesser and H. H. Heidtmann, "A leucine-to-proline substitution causes a defective alpha 1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease.," *Genomics*, vol. 17, no. 3, pp. 740-3, September 1993.
- [76] W. Poller, J. P. Faber, S. Scholz, S. Weidinger, K. Bartholomé, K. Olek and S. Eriksson, *Mis-sense mutation of alpha 1-antichymotrypsin gene associated with chronic lung disease.*, vol. 339, England, 1992, p. 1538.
- [77] R. R. Kew and R. O. Webster, "Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 82, no. 1, pp. 364-9, July 1988.
- [78] N. Yamamoto and S. Homma, "Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 19, pp. 8539-43, October 1991.
- [79] F. Kueppers, R. D. Miller, H. Gordon, N. G. Hepper and K. Offord, "Familial prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in a matched pair study.," *The American journal of medicine*, vol. 63, no. 3, pp. 336-42, September 1977.
- [80] N. Drakoulis, I. Cascorbi, J. Brockmöller, C. R. Gross and I. Roots, "Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region.," *The Clinical investigator*, vol. 72, no. 3, pp. 240-8, February 1994.
- [81] A. M. Cantlay, D. Lamb, M. Gillooly, J. Norrman, D. Morrison, C. A. Smith and D. J. Harrison, "Association between the CYP1A1 gene polymorphism and susceptibility to emphysema and lung cancer.," *Clinical molecular pathology*, vol. 48, no. 4, pp. M210-4, August 1995.

- [82] J. Björkander, B. Bake, V. A. Oxelius and L. A. Hanson, "Impaired lung function in patients with IgA deficiency and low levels of IgG2 or IgG3.," *The New England journal of medicine*, vol. 313, no. 12, pp. 720-4, September 1985.
- [83] S. O'Keeffe, A. Gzel, R. Drury, M. Cullina, J. Grealley and P. Finnegan, "Immunoglobulin G subclasses and spirometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease.," *The European respiratory journal*, vol. 4, no. 8, pp. 932-6, September 1991.
- [84] J. Travis and G. S. Salvesen, "Human plasma proteinase inhibitors.," *Annual review of biochemistry*, vol. 52, pp. 655-709, 1983.
- [85] A. Bashir, N. N. Shah, Y. M. Hazari, M. Habib, S. Bashir, N. Hilal, M. Banday, S. Asrafuzzaman and K. M. Fazili, "Novel variants of SERPIN1A gene: Interplay between alpha1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease.," *Respiratory medicine*, vol. 117, pp. 139-49, August 2016.
- [86] B. Korkmaz, M. S. Horwitz, D. E. Jenne and F. Gauthier, "Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases.," *Pharmacological reviews*, vol. 62, no. 4, pp. 726-59, December 2010.
- [87] N. Kalsheker, "Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene.," *Bioscience reports*, vol. 9, no. 2, pp. 129-38, April 1989.
- [88] C. Taggart, D. Cervantes-Laurean, G. Kim, N. G. McElvaney, N. Wehr, J. Moss and R. L. Levine, "Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 35, pp. 27258-65, September 2000.
- [89] S. Janciauskiene, "Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1535, no. 3, pp. 221-35, March 2001.
- [90] E. Karatas and M. Bouche-careilh, "Alpha 1-Antitrypsin Deficiency: A Disorder of Proteostasis-Mediated Protein Folding and Trafficking Pathways.," *International journal of molecular sciences*, vol. 21, no. 4, February 2020.
- [91] D. M. Dunlea, L. T. Fee, T. McEnery, N. G. McElvaney and E. P. Reeves, "The impact of alpha-1 antitrypsin augmentation therapy on neutrophil-driven respiratory disease in deficient individuals.," *Journal of inflammation research*, vol. 11, pp. 123-134, 2018.
- [92] M. Kalis, R. Kumar, S. Janciauskiene, A. Salehi and C. M. Cilio, " α 1-antitrypsin enhances insulin secretion and prevents cytokine-mediated apoptosis in pancreatic β -cells.," *Islets*, vol. 2, no. 3, pp. 185-9, May 2010.
- [93] C. Grimstein, Y.-K. Choi, C. H. Wasserfall, M. Satoh, M. A. Atkinson, M. L. Brantly, M. Campbell-Thompson and S. Song, "Alpha-1 antitrypsin protein and gene therapies decrease autoimmunity and delay arthritis development in mouse model.," *Journal of translational medicine*, vol. 9, p. 21, February 2011.

- [94] D. A. Bergin, E. P. Reeves, K. Hurley, R. Wolfe, R. Jameel, S. Fitzgerald and N. G. McElvaney, "The circulating proteinase inhibitor α -1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity.," *Science translational medicine*, vol. 6, no. 217, p. 217ra1, January 2014.
- [95] A. Churg, X. Wang, R. D. Wang, S. C. Meixner, E. L. G. Pryzdial and J. L. Wright, "Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 37, no. 2, pp. 144-51, August 2007.
- [96] E. P. Reeves, D. M. Dunlea, K. McQuillan, C. A. O'Dwyer, T. P. Carroll, R. Saldova, P. R. Akepati, M. R. Wormald, O. J. McElvaney, V. Shutchaidat, M. Henry, P. Meleady, J. Keenan, D. C. Liberti, D. N. Kotton, P. M. Rudd, A. A. Wilson and N. G. McElvaney, "Circulating Truncated Alpha-1 Antitrypsin Glycoprotein in Patient Plasma Retains Anti-Inflammatory Capacity.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 202, no. 8, pp. 2240-2253, April 2019.
- [97] C. Richards, J. Gauldie and H. Baumann, "Cytokine control of acute phase protein expression.," *European cytokine network*, vol. 2, no. 2, pp. 89-98, March 1991.
- [98] R. W. Carrell, J. O. Jeppsson, C. B. Laurell, S. O. Brennan, M. C. Owen, L. Vaughan and D. R. Boswell, "Structure and variation of human alpha 1-antitrypsin.," *Nature*, vol. 298, no. 5872, pp. 329-34, July 1982.
- [99] S. Janciauskiene, S. Wrenger, S. Immenschuh, B. Olejnicka, T. Greulich, T. Welte and J. Chorostowska-Wynimko, "The Multifaceted Effects of Alpha1-Antitrypsin on Neutrophil Functions.," *Frontiers in pharmacology*, vol. 9, p. 341, 2018.
- [100] W. Poller, T. E. Willnow, J. Hilpert and J. Herz, "Differential recognition of alpha 1-antitrypsin- elastase and alpha 1-antichymotrypsin-cathepsin G complexes by the low density lipoprotein receptor-related protein.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, no. 6, pp. 2841-5, February 1995.
- [101] D. H. Perlmutter, "Alpha-1-antitrypsin deficiency: biochemistry and clinical manifestations.," *Annals of medicine*, vol. 28, no. 5, pp. 385-94, October 1996.
- [102] S. Seixas and P. I. Marques, "Known Mutations at the Cause of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency an Updated Overview of SERPINA1 Variation Spectrum.," *The application of clinical genetics*, vol. 14, pp. 173-194, 2021.
- [103] M. Cazzola, D. Stolz, P. Rogliani and M. G. Matera, " α (1)-Antitrypsin deficiency and chronic respiratory disorders.," *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, vol. 29, no. 155, March 2020.
- [104] M. K. Fagerhol, „The Pi-system: genetic variants of serum alpha-1-antitrypsin,“ *Ser Haematol*, t. 1, p. 153–161, 1968.
- [105] S. Denden, J. B. Chibani i A. H. Khelil, „Origins and spreads of Alpha 1 antitrypsin variants in world human populations: a synthetic review,“ *International Journal of Modern Anthropology*, t. 1, May 2012.

- [106] J. K. Stoller, V. Hupertz and L. S. Aboussouan, *Alpha-1 Antitrypsin Deficiency*, M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp and A. Amemiya, Eds., Seattle (WA), 1993.
- [107] J. E. Gadek, G. A. Fells, R. L. Zimmerman, S. I. Rennard and R. G. Crystal, "Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 68, no. 4, pp. 889-98, October 1981.
- [108] F. J. de Serres and I. Blanco, "Prevalence of α 1-antitrypsin deficiency alleles PI*S and PI*Z worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes PI*MS, PI*MZ, PI*SS, PI*SZ, and PI*ZZ: a comprehensive review.," *Therapeutic advances in respiratory disease*, vol. 6, no. 5, pp. 277-95, October 2012.
- [109] D. A. Lomas, D. L. Evans, J. T. Finch and R. W. Carrell, "The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver.," *Nature*, vol. 357, no. 6379, pp. 605-7, June 1992.
- [110] R. W. Carrell, J. Whisstock and D. A. Lomas, "Conformational changes in serpins and the mechanism of alpha 1-antitrypsin deficiency.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 150, no. 6 Pt 2, pp. S171-5, December 1994.
- [111] J. H. Teckman and D. H. Perlmutter, "Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response.," *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, vol. 279, no. 5, pp. G961-74, November 2000.
- [112] D. Qu, J. H. Teckman, S. Omura and D. H. Perlmutter, "Degradation of a mutant secretory protein, alpha1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 37, pp. 22791-5, September 1996.
- [113] M. Odièvre, J. P. Martin, M. Hadchouel and D. Alagille, "Alpha1-antitrypsin deficiency and liver disease in children: phenotypes, manifestations, and prognosis.," *Pediatrics*, vol. 57, no. 2, pp. 226-31, February 1976.
- [114] A. Topic, D. Prokic and I. Stankovic, "Alpha-1-antitrypsin deficiency in early childhood.," *Fetal and pediatric pathology*, vol. 30, no. 5, pp. 312-9, 2011.
- [115] A. Topic, M. Ljujic and D. Radojkovic, "Alpha-1-antitrypsin in pathogenesis of hepatocellular carcinoma.," *Hepatitis monthly*, vol. 12, no. 10 HCC, p. e7042, October 2012.
- [116] S. N. Clemmensen, L. C. Jacobsen, S. Rørvig, B. Askaa, K. Christenson, M. Iversen, M. H. Jørgensen, M. T. Larsen, B. van Deurs, O. Ostergaard, N. H. Heegaard, J. B. Cowland and N. Borregaard, "Alpha-1-antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis.," *European journal of haematology*, vol. 86, no. 6, pp. 517-30, June 2011.
- [117] J. S. Parmar, R. Mahadeva, B. J. Reed, N. Farahi, K. A. Cadwallader, M. T. Keogan, D. Bilton, E. R. Chilvers and D. A. Lomas, "Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema.," *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 26, no. 6, pp. 723-30, June 2002.

- [118] S. Gholami i T. Hamzehloei, „Hereditary of Alpha-1-Antitrypsin Deficiency,“ *Shiraz E-Medical Journal*, t. 14, p. 63–75, 2013.
- [119] P. Salahuddin, "Genetic variants of alpha1-antitrypsin.," *Current protein & peptide science*, vol. 11, no. 2, pp. 101-17, March 2010.
- [120] J. O. Jeppsson, C. B. Laurell, B. Nosslin and D. W. Cox, "Catabolic rate of alpha1-antitrypsin of of Pi types S, and MMalton and of asialylated M-protein in man.," *Clinical science and molecular medicine*, vol. 55, no. 1, pp. 103-7, July 1978.
- [121] F. Ogushi, R. C. Hubbard, G. A. Fells, M. A. Casolaro, D. T. Curiel, M. L. Brantly and R. G. Crystal, "Evaluation of the S-type of alpha-1-antitrypsin as an in vivo and in vitro inhibitor of neutrophil elastase.," *The American review of respiratory disease*, vol. 137, no. 2, pp. 364-70, February 1988.
- [122] R. I. J. Garver, J. F. Mornex, T. Nukiwa, M. Brantly, M. Courtney, J. P. LeCocq and R. G. Crystal, "Alpha 1-antitrypsin deficiency and emphysema caused by homozygous inheritance of non-expressing alpha 1-antitrypsin genes.," *The New England journal of medicine*, vol. 314, no. 12, pp. 762-6, March 1986.
- [123] H. Okayama, M. Brantly, M. Holmes and R. G. Crystal, "Characterization of the molecular basis of the alpha 1-antitrypsin F allele.," *American journal of human genetics*, vol. 48, no. 6, pp. 1154-8, June 1991.
- [124] J. H. Lewis, R. M. Iammarino, J. A. Spero and U. Hasiba, "Antithrombin Pittsburgh: an alpha1-antitrypsin variant causing hemorrhagic disease.," *Blood*, vol. 51, no. 1, pp. 129-37, January 1978.
- [125] A. Beletic, A. Dudvarski-Ilic, B. Milenkovic, L. Nagorni-Obradovic, M. Ljubic, V. Djordjevic, D. Mirkovic, D. Radojkovic and N. Majkic-Singh, "Is an integrative laboratory algorithm more effective in detecting alpha-1-antitrypsin deficiency in patients with premature chronic obstructive pulmonary disease than AAT concentration based screening approach?," *Biochemia medica*, vol. 24, no. 2, pp. 293-8, 2014.
- [126] S. Kim, J. Woo, E. J. Seo, M. Yu and S. Ryu, "A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved alpha(1)-antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops.," *Journal of molecular biology*, vol. 306, no. 1, pp. 109-19, February 2001.
- [127] P. Arnaud, C. Chapuis-Cellier, P. Vittoz and H. H. Fudenberg, "Genetic polymorphism of serum alpha-1-protease inhibitor (alpha-1-antitrypsin): Pi i, a deficient allele of the Pi system.," *The Journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 92, no. 2, pp. 177-84, August 1978.
- [128] J. Holme and R. A. Stockley, "CT scan appearance, densitometry, and health status in protease inhibitor SZ alpha1-antitrypsin deficiency.," *Chest*, vol. 136, no. 5, pp. 1284-1290, November 2009.
- [129] C. P. Kelly, D. N. Tyrrell, G. S. McDonald, D. B. Whitehouse and J. S. Prichard, "Heterozygous FZ alpha 1 antitrypsin deficiency associated with severe emphysema and hepatic disease: case report and family study.," *Thorax*, vol. 44, no. 9, pp. 758-9, September 1989.

- [130] B. Brand, G. H. Beahler and R. Gould, "Cirrhosis and heterozygous FZ alpha-1-antitrypsin deficiency in an adult. Case report and review of the literature.," *Gastroenterology*, vol. 66, no. 2, pp. 264-8, February 1974.
- [131] N. J. Sinden, F. Koura and R. A. Stockley, "The significance of the F variant of alpha-1-antitrypsin and unique case report of a PiFF homozygote.," *BMC pulmonary medicine*, vol. 14, p. 132, August 2014.
- [132] S. Janciauskiene and T. Welte, "Well-Known and Less Well-Known Functions of Alpha-1 Antitrypsin. Its Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Other Disease Developments.," *Annals of the American Thoracic Society*, vol. 13 Suppl 4, pp. S280-8, August 2016.
- [133] B. C. Lee, A. Dikiy, H.-Y. Kim and V. N. Gladyshev, "Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1790, no. 11, pp. 1471-7, November 2009.
- [134] S. X. Gu, J. W. Stevens and S. R. Lentz, "Regulation of thrombosis and vascular function by protein methionine oxidation.," *Blood*, vol. 125, no. 25, pp. 3851-9, June 2015.
- [135] W. T. Lowther, N. Brot, H. Weissbach, J. F. Honek and B. W. Matthews, "Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 12, pp. 6463-8, June 2000.
- [136] F. M. Ranaivoson, M. Antoine, B. Kauffmann, S. Boschi-Muller, A. Aubry, G. Branlant and F. Favier, "A structural analysis of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase A from *Neisseria meningitidis*.," *Journal of molecular biology*, vol. 377, no. 1, pp. 268-80, March 2008.
- [137] S. Lourenço Dos Santos, I. Petropoulos and B. Friguet, "The Oxidized Protein Repair Enzymes Methionine Sulfoxide Reductases and Their Roles in Protecting against Oxidative Stress, in Ageing and in Regulating Protein Function.," *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, vol. 7, no. 12, December 2018.
- [138] H. Gu, W. Chen, J. Yin, S. Chen, J. Zhang and J. Gong, "Methionine sulfoxide reductase A rs10903323 G/A polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population.," *Clinical biochemistry*, vol. 46, no. 16-17, pp. 1668-72, November 2013.
- [139] W. R. Abrams, G. Weinbaum, L. Weissbach, H. Weissbach and N. Brot, "Enzymatic reduction of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor restores biological activity.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 12, pp. 7483-6, December 1981.
- [140] M. Reiterer, R. Schmidt-Kastner and S. L. Milton, "Methionine sulfoxide reductase (Msr) dysfunction in human brain disease.," *Free radical research*, vol. 53, no. 11-12, pp. 1144-1154, December 2019.
- [141] D. B. Oien and J. Moskovitz, "Genetic regulation of longevity and age-associated diseases through the methionine sulfoxide reductase system.," *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, vol. 1865, no. 7, pp. 1756-1762, July 2019.
- [142] K. U. Schallreuter, K. Rübsam, N. C. J. Gibbons, D. J. Maitland, B. Chavan, C. Zothner, H. Rokos and J. M. Wood, "Methionine sulfoxide reductases A and B are deactivated by hydrogen peroxide (H₂O₂)

in the epidermis of patients with vitiligo.," *The Journal of investigative dermatology*, vol. 128, no. 4, pp. 808-15, April 2008.

- [143] J.-E. Martín, B. Z. Alizadeh, M. A. González-Gay, A. Balsa, D. Pascual-Salcedo, B. Fernández-Gutiérrez, E. Raya, L. Franke, R. van't Slot, M. J. H. Coenen, P. van Riel, T. R. D. J. Radstake, B. P. C. Koeleman and J. Martín, "Identification of the oxidative stress-related gene MSRA as a rheumatoid arthritis susceptibility locus by genome-wide pathway analysis.," *Arthritis and rheumatism*, vol. 62, no. 11, pp. 3183-90, November 2010.
- [144] Y. Zhang, H. Zhang, C. Zhuang, R. Liu and J. Wei, "MSRA polymorphism is associated with the risk of rheumatoid arthritis in a Chinese population.," *Scandinavian journal of rheumatology*, vol. 42, no. 2, pp. 91-6, 2013.
- [145] M. García-Bermúdez, R. López-Mejías, C. González-Juanatey, S. Castañeda, J. A. Miranda-Filloo, R. Blanco, B. Fernández-Gutiérrez, A. Balsa, I. González-Álvaro, C. Gómez-Vaquero, J. Llorca, J. Martín and M. A. González-Gay, "Association of the methionine sulfoxide reductase A rs10903323 gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis.," *Scandinavian journal of rheumatology*, vol. 41, no. 5, pp. 350-3, October 2012.
- [146] J. Bieth, B. Spiess and C. G. Wermuth, "The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase.," *Biochemical medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 350-7, December 1974.
- [147] G. W. Schwert and Y. Takenaka, "A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 16, no. 4, pp. 570-5, April 1955.
- [148] K. Beatty, P. Robertie, R. M. Senior and J. Travis, "Determination of oxidized alpha-1-proteinase inhibitor in serum.," *The Journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 100, no. 2, pp. 186-92, August 1982.
- [149] F. Moraga and S. Janciauskiene, "Activation of primary human monocytes by the oxidized form of alpha1-antitrypsin.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 11, pp. 7693-700, March 2000.
- [150] G. Jori, G. Galiazzo, A. Marzotto and E. Scoffone, "Selective and reversible photo-oxidation of the methionyl residues in lysozyme.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 243, no. 16, pp. 4272-8, August 1968.
- [151] C. Larsson, "Natural history and life expectancy in severe alpha1-antitrypsin deficiency, Pi Z.," *Acta medica Scandinavica*, vol. 204, no. 5, pp. 345-51, 1978.
- [152] E. Piitulainen and S. Eriksson, "Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ).," *The European respiratory journal*, vol. 13, no. 2, pp. 247-51, February 1999.
- [153] S. Kasagi, K. Seyama and Y. Fukuchi, "[Proteases involved in airway inflammation of COPD].," *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, vol. 61, no. 12, pp. 2113-8, December 2003.

- [154] G. Viegi, F. Pistelli, D. L. Sherrill, S. Maio, S. Baldacci and L. Carrozzi, "Definition, epidemiology and natural history of COPD.," *The European respiratory journal*, vol. 30, no. 5, pp. 993-1013, November 2007.
- [155] B. M. Fischer, E. Pavlisko and J. A. Voynow, "Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 6, pp. 413-21, 2011.
- [156] G. Perincek and S. Avci, "Evaluation of alpha-1-antitrypsin levels in blood serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease.," *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*, vol. 90, no. 1, pp. 37-43, October 2018.
- [157] Z. Sun and P. Yang, "Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression.," *The Lancet. Oncology*, vol. 5, no. 3, pp. 182-90, March 2004.
- [158] N. Takei, M. Suzuki, H. Makita, S. Konno, K. Shimizu, H. Kimura, H. Kimura and M. Nishimura, "Serum Alpha-1 Antitrypsin Levels and the Clinical Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 14, pp. 2885-2893, 2019.
- [159] A. R. Koczulla, S. Noeske, C. Herr, J. Koepke, R. A. Jörres, C. Nell, S. Schmid, C. Vogelmeier and R. Bals, "Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients.," *Respiratory medicine*, vol. 106, no. 1, pp. 120-6, January 2012.
- [160] T. S. Ingebrigtsen, J. L. Marott, L. Rode, J. Vestbo, P. Lange and B. G. Nordestgaard, "Fibrinogen and α 1-antitrypsin in COPD exacerbations.," *Thorax*, vol. 70, no. 11, pp. 1014-21, November 2015.
- [161] P. J. Barnes and B. R. Celli, "Systemic manifestations and comorbidities of COPD.," *The European respiratory journal*, vol. 33, no. 5, pp. 1165-85, May 2009.
- [162] C. L. Sanders, A. Ponte and F. Kueppers, "The Effects of Inflammation on Alpha 1 Antitrypsin Levels in a National Screening Cohort.," *COPD*, vol. 15, no. 1, pp. 10-16, February 2018.
- [163] P. Lacy, "Mechanisms of degranulation in neutrophils.," *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 2, no. 3, pp. 98-108, September 2006.
- [164] W. MacNee, *Pathology, pathogenesis, and pathophysiology.*, vol. 332, 2006, pp. 1202-4.
- [165] N. Patel, J. Belcher, G. Thorpe, N. R. Forsyth and M. A. Spiteri, "Measurement of C-reactive protein, procalcitonin and neutrophil elastase in saliva of COPD patients and healthy controls: correlation to self-reported wellbeing parameters.," *Respiratory research*, vol. 16, no. 1, p. 62, May 2015.
- [166] J. J. Sng, S. Prazakova, P. S. Thomas and C. Herbert, "MMP-8, MMP-9 and Neutrophil Elastase in Peripheral Blood and Exhaled Breath Condensate in COPD.," *COPD*, vol. 14, no. 2, pp. 238-244, April 2017.

- [167] J. H. Nuijens, J. J. Abbink, Y. T. Wachtfogel, R. W. Colman, A. J. Eerenberg, D. Dors, A. J. Kamp, R. J. Strack van Schijndel, L. G. Thijs and C. E. Hack, "Plasma elastase alpha 1-antitrypsin and lactoferrin in sepsis: evidence for neutrophils as mediators in fatal sepsis.," *The Journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 119, no. 2, pp. 159-68, February 1992.
- [168] R. Kamal, A. K. Srivastava and C. N. Kesavachandran, "Meta-analysis approach to study the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease among current, former and non-smokers.," *Toxicology reports*, vol. 2, pp. 1064-1074, 2015.
- [169] M. G. Cosio, K. A. Hale and D. E. Niewoehner, "Morphologic and morphometric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways.," *The American review of respiratory disease*, vol. 122, no. 2, pp. 265-271, August 1980.
- [170] M. Padrines, M. Schneider-Pozzer and J. G. Bieth, "Inhibition of neutrophil elastase by alpha-1-proteinase inhibitor oxidized by activated neutrophils.," *The American review of respiratory disease*, vol. 139, no. 3, pp. 783-90, March 1989.
- [171] A. Janoff, H. Carp, D. K. Lee and R. T. Drew, "Cigarette smoke inhalation decreases alpha 1-antitrypsin activity in rat lung.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 206, no. 4424, pp. 1313-4, December 1979.
- [172] H. Carp and A. Janoff, "Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants.," *The American review of respiratory disease*, vol. 118, no. 3, pp. 617-21, September 1978.
- [173] H. Carp, F. Miller, J. R. Hoidal and A. Janoff, "Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 79, no. 6, pp. 2041-5, March 1982.
- [174] V. V. Damiano, A. Sandler, W. R. Abrams, D. R. Meranze, A. B. Cohen, P. Kimbel and G. Weinbaum, "Electron and light microscopic studies of the lungs of chloramine-T treated dogs.," *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire*, vol. 16 Suppl, pp. 141-56, 1980.
- [175] R. C. Hubbard, F. Ogushi, G. A. Fells, A. M. Cantin, S. Jallat, M. Courtney and R. G. Crystal, "Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 80, no. 5, pp. 1289-95, November 1987.
- [176] V. Mohsenin, "Lipid peroxidation and antielastase activity in the lung under oxidant stress: role of antioxidant defenses.," *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, vol. 70, no. 4, pp. 1456-62, April 1991.
- [177] D. M. Mannino, M. M. Reichert and K. J. Davis, "Lung function decline and outcomes in an adult population.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 173, no. 9, pp. 985-90, May 2006.

- [178] P. J. Barnes, "Sex Differences in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Mechanisms.," in *American journal of respiratory and critical care medicine*, United States, 2016.
- [179] W. Q. Gan, S. F. P. Man, D. S. Postma, P. Camp and D. D. Sin, "Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis.," *Respiratory research*, vol. 7, no. 1, p. 52, March 2006.
- [180] A. Langhammer, R. Johnsen, A. Gulsvik, T. L. Holmen and L. Bjermer, "Sex differences in lung vulnerability to tobacco smoking.," *The European respiratory journal*, vol. 21, no. 6, pp. 1017-23, June 2003.
- [181] I.-C. Sørheim, A. Johannessen, A. Gulsvik, P. S. Bakke, E. K. Silverman and D. L. DeMeo, "Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men?," *Thorax*, vol. 65, no. 6, pp. 480-5, June 2010.
- [182] G. Ntritsos, J. Franek, L. Belbasis, M. A. Christou, G. Markozannes, P. Altman, R. Fogel, T. Sayre, E. E. Ntzani and E. Evangelou, "Gender-specific estimates of COPD prevalence: a systematic review and meta-analysis.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 13, pp. 1507-1514, 2018.
- [183] F. J. Martinez, J. L. Curtis, F. Sciurba, J. Mumford, N. D. Giardino, G. Weinmann, E. Kazerooni, S. Murray, G. J. Criner, D. D. Sin, J. Hogg, A. L. Ries, M. Han, A. P. Fishman, B. Make, E. A. Hoffman, Z. Mohsenifar and R. Wise, "Sex differences in severe pulmonary emphysema.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 176, no. 3, pp. 243-52, August 2007.
- [184] S. Ben-Zaken Cohen, P. D. Paré, S. F. P. Man and D. D. Sin, "The growing burden of chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer in women: examining sex differences in cigarette smoke metabolism.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 176, no. 2, pp. 113-20, July 2007.
- [185] B. Meibohm, I. Beierle and H. Derendorf, "How important are gender differences in pharmacokinetics?," *Clinical pharmacokinetics*, vol. 41, no. 5, pp. 329-42, 2002.
- [186] N. Al Koudsi, J. C. Mwenifumbo, E. M. Sellers, N. L. Benowitz, G. E. Swan and R. F. Tyndale, "Characterization of the novel CYP2A6*21 allele using in vivo nicotine kinetics.," *European journal of clinical pharmacology*, vol. 62, no. 6, pp. 481-4, June 2006.
- [187] J. R. Cashman, S. B. Park, Z. C. Yang, S. A. Wrighton, P. 3. Jacob and N. L. Benowitz, "Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans-nicotine N'-oxide.," *Chemical research in toxicology*, vol. 5, no. 5, pp. 639-46, September 1992.
- [188] D. D. Sin, S. B.-Z. Cohen, A. Day, H. Coxson and P. D. Paré, "Understanding the biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women.," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 4, no. 8, pp. 671-4, December 2007.
- [189] L. Watson, J. M. Vonk, C. G. Löfdahl, N. B. Pride, R. A. Pauwels, L. A. Laitinen, J. P. Schouten and D. S. Postma, "Predictors of lung function and its decline in mild to moderate COPD in association with

gender: results from the Euroscop study.," *Respiratory medicine*, vol. 100, no. 4, pp. 746-53, April 2006.

- [190] M. Luisetti and N. Seersholm, "Alpha1-antitrypsin deficiency. 1: epidemiology of alpha1-antitrypsin deficiency.," *Thorax*, vol. 59, no. 2, pp. 164-9, February 2004.
- [191] R. A. Stockley, "Alpha 1-antitrypsin: more than just deficiency.," in *Thorax*, England, 2004.
- [192] 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.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 168, no. 7, pp. 818-900, October 2003.
- [193] E. Balcells, J. M. Antó, J. Gea, F. P. Gómez, E. Rodríguez, A. Marin, A. Ferrer, J. de Batlle, E. Farrero, M. Benet, M. Orozco-Levi, J. Ferrer, A. G. Agustí, J. B. Gáldiz, J. Belda and J. Garcia-Aymerich, "Characteristics of patients admitted for the first time for COPD exacerbation.," *Respiratory medicine*, vol. 103, no. 9, pp. 1293-302, September 2009.
- [194] "Alpha(1)-proteinase inhibitor (human).," *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, vol. 35, no. 3 Section 2, pp. 2-6, March 2010.
- [195] J. K. Stoller, V. Hupertz i L. S. Aboussouan, „Alpha-1 Antitrypsin Deficiency,“ *Oct 27 [Updated 2023 Jun 1]. In: Adam MP*, tom. %1 od %21993-2023., 2023.
- [196] J. M. Hernández-Pérez, R. Ramos-Díaz, C. Vaquerizo-Pollino and J. A. Pérez, "Frequency of alleles and genotypes associated with alpha-1 antitrypsin deficiency in clinical and general populations: Revelations about underdiagnosis.," *Pulmonology*, vol. 29, no. 3, pp. 214-220, May 2023.
- [197] T. Greulich, A. Averyanov, L. Borsa, E. Rozborilová, D. Vaicius, T. Major, V. Chopyak, V. Tudorache, T. Konstantinova and S. Camprubí, "European screening for alpha(1) -antitrypsin deficiency in subjects with lung disease.," *The clinical respiratory journal*, vol. 11, no. 1, pp. 90-97, January 2017.
- [198] Z. Jelić-Ivanović, V. Spasojević-Kalimanovska, A. Topić, S. Spasić and V. Petrović, "alpha-1-Antitrypsin (Pi) polymorphism in Serbia: deviation of Pi M subtype distribution from the Hardy-Weinberg equilibrium.," *Gene geography : a computerized bulletin on human gene frequencies*, vol. 8, no. 2, pp. 129-35, August 1994.
- [199] A. Topic, M. Stankovic, A. Divac-Rankov, N. Petrovic-Stanojevic, M. Mitic-Milikic, L. Nagorni-Obradovic and D. Radojkovic, "Alpha-1-antitrypsin deficiency in Serbian adults with lung diseases.," *Genetic testing and molecular biomarkers*, vol. 16, no. 11, pp. 1282-6, November 2012.
- [200] M. Dahl, B. G. Nordestgaard, P. Lange, J. Vestbo and A. Tybjaerg-Hansen, "Molecular diagnosis of intermediate and severe alpha(1)-antitrypsin deficiency: MZ individuals with chronic obstructive pulmonary disease may have lower lung function than MM individuals.," *Clinical chemistry*, vol. 47, no. 1, pp. 56-62, January 2001.

- [201] J. E. Wigginton, D. J. Cutler and G. R. Abecasis, "A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium.," *American journal of human genetics*, vol. 76, no. 5, pp. 887-93, May 2005.
- [202] F. J. de Serres, "Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys.," *Chest*, vol. 122, no. 5, pp. 1818-29, November 2002.
- [203] C. Martínez-González, I. Blanco, I. Diego, P. Bueno and M. Miravittles, "Estimated Prevalence and Number of PiMZ Genotypes of Alpha-1 Antitrypsin in Seventy-Four Countries Worldwide.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 16, pp. 2617-2630, 2021.
- [204] Z. Rabekova, S. Frankova, M. Jirsa, M. Neroldova, M. Lunova, O. Fabian, M. Kveton, D. Varys, K. Chmelova, V. Adamkova, J. A. Hubacek, J. Spicak, D. Merta and J. Sperl, "Alpha-1 Antitrypsin and Hepatocellular Carcinoma in Liver Cirrhosis: SERPINA1 MZ or MS Genotype Carriage Decreases the Risk.," *International journal of molecular sciences*, vol. 22, no. 19, September 2021.
- [205] A. J. Ghosh, B. D. Hobbs, M. Moll, A. Saferali, A. Boueiz, J. H. Yun, F. Scirba, L. Barwick, A. H. Limper, K. Flaherty, G. Criner, K. K. Brown, R. Wise, F. J. Martinez, D. Lomas, P. J. Castaldi, V. J. Carey, D. L. DeMeo, M. H. Cho, E. K. Silverman and C. P. Hersh, "Alpha-1 Antitrypsin MZ Heterozygosity Is an Endotype of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.," *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 205, no. 3, pp. 313-323, February 2022.
- [206] C. P. Hersh, M. Dahl, N. P. Ly, C. S. Berkey, B. G. Nordestgaard and E. K. Silverman, "Chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis.," *Thorax*, vol. 59, no. 10, pp. 843-9, October 2004.
- [207] H. A. Tanash, P. M. Nilsson, J.-A. Nilsson and E. Piitulainen, "Clinical course and prognosis of never-smokers with severe alpha-1-antitrypsin deficiency (PiZZ).," *Thorax*, vol. 63, no. 12, pp. 1091-5, December 2008.
- [208] J. G. W. Burdon, S. Brenton, V. Hocking, K. R. Knight, M. Ayad, L. Cook and E. D. Janus, "Decline in FEV1 in patients with PiZ alpha-1-antitrypsin deficiency: the Australian experience.," *Respirology (Carlton, Vic.)*, vol. 7, no. 1, pp. 51-5, March 2002.
- [209] C. Esquinas, S. Serreri, M. Barrecheguren, E. Rodriguez, A. Nuñez, F. Casas-Maldonado, I. Blanco, P. Pirina, B. Lara and M. Miravittles, "Long-term evolution of lung function in individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency from the Spanish registry (REDAAT).," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 13, pp. 1001-1007, 2018.
- [210] R. Madison, C. Mittman, A. A. Afifi and R. Zelman, "Risk factors for obstructive lung disease.," *The American review of respiratory disease*, vol. 124, no. 2, pp. 149-53, August 1981.
- [211] F. Pierre, Q. T. Pham, J. M. Mur, N. Chau and J. P. Martin, "Respiratory symptoms and pulmonary function in 871 miners according to Pi phenotype: a longitudinal study.," *European journal of epidemiology*, vol. 4, no. 1, pp. 39-44, March 1988.

- [212] M. Berode, P. Leuenberger and H. Savolainen, "Phenotype-dependent inhibition of human alpha 1-antitrypsin by 1,6-hexane diamine in vitro.," *Biochemistry international*, vol. 17, no. 1, pp. 141-5, July 1988.
- [213] SelfDecode, „Single Nucleotide Polymorphism Report,“ 2018. [Na mreži]. Available: <https://selfdecode.com/snp/rs10903323/>. [Poslednji pristup 6 January 2021].
- [214] A. Hansel, S. H. Heinemann and T. Hoshi, "Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1703, no. 2, pp. 239-47, January 2005.
- [215] M. Kantorow, J. R. Hawse, T. L. Cowell, S. Benhamed, G. O. Pizarro, V. N. Reddy and J. F. Hejtmancik, "Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 26, pp. 9654-9, June 2004.
- [216] M. J. Hokenson, V. N. Uversky, J. Goers, G. Yamin, L. A. Munishkina and A. L. Fink, "Role of individual methionines in the fibrillation of methionine-oxidized alpha-synuclein.," *Biochemistry*, vol. 43, no. 15, pp. 4621-33, April 2004.
- [217] S. J. Kim, J. Lee, Y. S. Park, C.-H. Lee, H. I. Yoon, S.-M. Lee, J.-J. Yim, Y. W. Kim, S. K. Han and C.-G. Yoo, "Age-related annual decline of lung function in patients with COPD.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 11, pp. 51-60, 2016.
- [218] Y. Liu, R. A. Pleasants, J. B. Croft, A. G. Wheaton, K. Heidari, A. M. Malarcher, J. A. Ohar, M. Kraft, D. M. Mannino and C. Strange, "Smoking duration, respiratory symptoms, and COPD in adults aged ≥ 45 years with a smoking history.," *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, vol. 10, pp. 1409-16, 2015.

8. Biografija

Vera Milovanović je rođena 24.09.1983. u Prokuplju. Srednju Medicinsku školu završila je u Beogradu. U maju 2010. godine diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar sa prosečnom ocenom 8,50.

Po završetku fakulteta, obavezan pripravnički staž obavlja u Kliničko-bolničkom centru „Dr Dragiša Mišović“ nakon čega u junu 2011. godine uspešno polaže stručni ispit za farmaceute-medicinske biohemičare u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije. Školske 2014./2015. godine upisuje doktorske akademske studije na modulu Medicinska biohemija.

Tokom svoje karijere radila je kao medicinski biohemičar u laboratoriji Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović“ a potom u centralnoj laboratoriji Medigroup.

Trenutno radi kao aplikativni saradnik na programu hemostaze u okviru kompanije Vicor.

Autor i koautor je u dva rada objavljenih u međunarodnim časopisima kategorije M22 i M21a.

9. Izjave

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Вера Миловановић

Број индекса 27/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа 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, 19.04.2024.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Вера Миловановић

Број индекса 27/2014

Студијски програм Докторске академске студије модул Медицинска биохемија

Наслов рада Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа у популацији Србије

Ментор Проф. др Александра Топић

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, 19.04.2024.

Изјава о коришћењу

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

Значај алфа-1-антитрипсина и метионин сулфоксид редуктазе А у настанку и прогресији хроничне опструктивне болести плућа 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, 19.04.2024.

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.