

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Sveučilište u Dubrovniku

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij

Molekularne bioznanosti

Mr.sc. Vesna Sredoja Tišma

**ULOGA OKSIDACIJSKOG STRESA I AKROLEINA U BOLESNIKA S
VASKULITISOM MALIH KRVNIH ŽILA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Osijek, 2014.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu

Sveučilište u Dubrovniku

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij

Molekularne bioznanosti

Mr.sc. Vesna Sredoja Tišma

**ULOGA OKSIDACIJSKOG STRESA I AKROLEINA U BOLESNIKA S
VASKULITISOM MALIH KRVNIH ŽILA**

Doktorska disertacija predložena

Sveučilišnom vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije

u svrhu stjecanja doktorata znanosti

Osijek, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni

doktorski studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti

ULOGA OKSIDACIJSKOG STRESA I AKROLEINA U BOLESNIKA S VASKULITISOM MALIH KRVNIH ŽILA

Vesna Sredoja Tišma

Rad je izrađen u: Ambulanti za kofne i spolne bolesti Kabineta za dermatovenerologiju KB Dubrava u Zagrebu, Klini kog zavodu za patologiju KB Dubrava u Zagrebu i Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

Mentor/i: *Doc.dr.sc. Stela Bulimbašić*

Dr.sc. Morana Jaganjac

Kratki sažetak doktorskog rada: Vaskulitis malih krvnih žila (VMKfi) je upala stijenke krvnih žila koja može dovesti do krvarenja i/ili ishemije. Pretpostavka je da su oksidacijski stres i akrolein povezani s patogeneom VMKfi. U histolo-kom nalazu VMKfi karakterističan je nalaz neutrofila, koji otpu-taju reaktivne kisikove spojeve (ROS). ROS mogu dovesti do lan ane reakcije lipidne peroksidacije pri emu nastaju reaktivni aldehidi, među kojima je i akrolein. Istraživanje se sastojalo od odre ivanja ukupnog oksidacijskog kapaciteta u serumu, odre ivanja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u serumu te imunohistokemijske analize akroleina u biopstatima kofe. Ukupni oksidacijski kapacitet u serumu bio je vi-i, a ukupni antioksidacijski kapacitet bio je znatno niži u bolesnika s VMKfi u odnosu na zdrave ispitanike iz kontrolne skupine ($p < 0,05$). Intenzitet ekspresije akroleina bio je zna ajno ve i u uzorcima kofe bolesnika s VMKfi u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$), a ekspresija akroleina bila je intenzivnija u bolesnika floridne faze i ja eg intenziteta bolesti. Rezultati ove studije podupiru ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi bolesti. Stoga, ova studija može pomo i u daljnjim istraživanjima mogu nosti i primjene lijekova s antioksidacijskim svojstvima u lije enju bolesnika s VMKfi.

Broj stranica: 122

Broj slika: 34

Broj tablica: 19

Broj literaturnih navoda: 208

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: vaskulitis malih krvnih žila, akrolein, oksidacijski stres

Datum obrane: 14. srpnja 2014.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv.prof.dr.sc. Neven Fiarković, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, predsjednik
2. doc.dr.sc. Stela Bulimbašić, spec. patolog Klini kog zavoda za patologiju KB Dubrava, Zagreb, mentorica 1 i lan
3. dr.sc. Morana Jaganjac, znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, mentorica 2 i lan
4. prof.dr.sc. Jerko Barbić, redoviti profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku, lan
5. prof.dr.sc. Vera Cesar, redovita profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju, lan
6. doc.dr.sc. Suzana Ljubojević Hadžlavić, spec. dermatovenerolog Klinike za kofne i spolne bolesti KBC Zagreb, zamjena lana

Rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

PhD thesis

University of Dubrovnik

Ruder Bošković Institute

University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of

Molecular biosciences

Scientific Area: Biomedicine and Health

Scientific Field: Basic Medical Sciences

THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS AND ACROLEIN IN PATIENTS WITH SMALL – VESSEL VASCULITIS

Vesna Sredoja Tišma

Thesis performed at: Polyclinic Department of Dermatology and Venereology, Dubrava University Hospital; Department of Pathology, Dubrava University Hospital; Laboratory for Oxidative Stress, Rudjer Boskovic Institute

Supervisor/s: Assist. Prof. *Stela Bulimbasic*, MD, PhD

Morana Jaganjac, PhD, Senior Scientist

Short abstract: Small-vessel vasculitis (SVV) is an inflammation of the vessel wall that can result in hemorrhage and/or ischemia. The assumption is that oxidative stress and acrolein are associated with the pathogenesis of SVV. The characteristic histological findings in SVV are neutrophils that release excessive reactive oxygen species (ROS). ROS can trigger chain reaction of lipid peroxidation leading to formation of reactive aldehydes, such as acrolein. The investigation consisted of measurements of serum total oxidative capacity, serum total antioxidative capacity, and immunohistochemical analysis of acrolein in skin tissue samples. Serum total oxidative capacity was higher and serum total antioxidative capacity was significantly lower in patients with SVV than in healthy control subjects ($p < 0,05$). Compared with control subjects, intensity of acrolein positivity was significantly higher ($p < 0,05$) in skin samples from patients with SVV, especially those with severe disease. The results of this study support the role of the oxidative stress in the pathogenesis of the disease. Therefore, this study may assist in the search for novel pharmacologic agents with antioxidant properties to treat affected patients.

Number of pages: 122

Number of figures: 34

Number of tables: 19

Number of references: 208

Original in: Croatian

Key words: small-vessel vasculitis, acrolein, oxidative stress

Date of the thesis defense: 14th July 2014

Reviewers:

1. Associate Prof. Neven Fiarkovi, MD, PhD, Senior Scientist
2. Assist. Prof. Stela Bulimbasic, MD, PhD
3. Morana Jaganjac, PhD, Senior Scientist
4. Prof. Jerko Barbi, MD, PhD
5. Prof. Vera Cesar, PhD
6. Assist. Prof. Suzana Ljubojevi Hadžavdi, MD, PhD (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Ambulanti za kožne i spolne bolesti Kabineta za dermatovenerologiju KB Dubrava u Zagrebu, Kliničkom zavodu za patologiju KB Dubrava u Zagrebu i Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Stele Bulimbašić i dr.sc. Morane Jaganjac.

Ovaj rad posvećujem svojim najdražima,

suprugu Igoru

i djeci - Ivanu, Franu i Magdaleni.

VELIKU ZAHVALNOST NA POMOĆI U STVARANJU OVOG RADA DUGUJEM:

- *svojim mentoricama, doc.dr.sc. Steli Bulimbašić i dr.sc. Morani Jaganjac, na stručnoj i prijateljskoj podršci u planiranju, izradi i pisanju rada*
- *doc.dr.sc. Steli Bulimbašić na odličnoj kliničko-patološkoj suradnji*
- *dr.sc. Morani Jaganjac na prenesenom znanju i dugogodišnjem trudu uloženom u moj znanstveni razvoj*
- *prof.dr.sc. Nevenu Žarkoviću, na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i velikoj podršci u izradi ovog rada*
- *prof.dr.sc. Danici Galešić Ljubanović, na prvom velikom poticaju za ovaj rad, konstruktivnim prijedlozima u pravim trenucima, pruženoj prilici i ukazanom povjerenju*
- *dr. Franzu Tatzberu i dr. Koji Uchida, na podršci u reagensima za izvođenje eksperimentalnog dijela rada*
- *prof.dr.sc. Krešimiru Galešiću i suradnicima iz Zavoda za nefrologiju KB Dubrava, na susretljivosti, znanstvenoj podršci i nesebičnoj pomoći u odabiru i prikupljanju kliničkih podataka i uzoraka ispitanika uključenih u ovaj rad*
- *prof.dr.sc. Jadranki Morović Vergles, dr.sc. Jošku Mitroviću i svim djelatnicima Zavoda za kliničku imunologiju i reumatologiju KB Dubrava, na susretljivosti, razumijevanju i podršci u izvođenju kliničkog dijela rada*
- *prof.dr.sc. Željku Romiću, na susretljivosti i podršci u kliničko-laboratorijskoj obradi uzoraka*
- *svim članovima Laboratorija za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković, na izvrsnoj suradnji i pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela rada*
- *Kliničkom zavodu za patologiju KB Dubrava, na odličnoj tehničkoj podršci u prikupljanju i obradi uzoraka*
- *Anamariji Šešljaga, lab. teh. na pomoći u tehničkoj pripremi laboratorijskih uzoraka*
- *svim članovima Povjerenstva za ocjenu rada*
- *mnogobrojnim prijateljima, koji su na bilo koji drugi način pomogli*
- *mojoj obitelji, koja je bila uvijek uz mene i bez čije ljubavi, razumijevanja i podrške ne bih uspjela*

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD	1
1.1 VASKULITIS	1
1.1.1 VASKULITIS U KOŽI	1
1.1.2 NOMENKLATURA I KLASIFIKACIJA VASKULITISA	1
1.1.3 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA VASKULITISA	5
1.1.4 KLINIČKA SLIKA VASKULITISA MALIH KRVNIH ŽILA (VMKŽ)	8
1.1.4.1 Klinička slika kožnog leukocitoklastičnog angiitisa (KLCA).....	9
1.1.4.2 Kliničko-patološka korelacija VMKŽ u koži.....	11
1.1.5 ULOGA BIOPSIJE KOŽE U DIJAGNOSTICI VMKŽ	12
1.1.6 DIJAGNOZA I LIJEČENJE VMKŽ	14
1.1.7 TIJEK BOLESTI I PROGNOZA.....	16
1.1.8 PATOGENEZA I IMPLIKACIJA PATOGENEZE NA LIJEČENJE VASKULITISA	18
1.2 OKSIDACIJSKI STRES, REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI (ROS) I AKROLEIN (ACR)	21
1.2.1 LIPIDNA PEROKSIDACIJA (LPO).....	22
1.2.2 ANTIOKSIDACIJSKI MEHANIZMI	24
1.2.3 AKROLEIN (ACR)	26
1.3 OKSIDACIJSKI STRES, AKROLEIN I VASKULITIS MALIH KRVNIH ŽILA KOŽE (VMKŽ)	27
1.3.1 KOŽA I OKSIDACIJSKI STRES.....	27
1.3.2 OKSIDACIJSKI STRES, AKROLEIN I VMKŽ	28
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. ISPITANICI I METODE	32
3.1 ISPITANICI	32
3.1.1 ISPITANICI U RETROSPEKTIVNOM DIJELU RADA	32
3.1.2 ISPITANICI U PROSPEKTIVNOM DIJELU RADA	33
3.2 METODE	34
3.2.1 ANAMNEZA	34
3.2.2 DIJAGNOSTIČKA OBRADA	34
3.2.3 BIOPSIJA KOŽE	35
3.2.4 PATOHISTOLOŠKA ANALIZA BIOPTATA KOŽE.....	36
3.2.5 IMUNOHISTOKEMIJSKO ODREĐIVANJE AKROLEINA U BIOPTATIMA KOŽE – PROCJENA OKSIDACIJSKOG STRESA NA LOKALNOJ RAZINI	38

3.2.6 VENEPUNKCIJA, PRIKUPLJANJE I POHRANJIVANJE UZORAKA KRVI	39
3.2.7 ODREĐIVANJE UKUPNOG OKSIDACIJSKOG KAPACITETA (TOC) I UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA (TAC) – PROCJENA OKSIDACIJSKOG STRESA NA SISTEMSKOJ RAZINI	40
3.2.7.1 Određivanje aktivnosti peroksida u serumu - TOC.....	40
3.2.7.2 Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta - TAC.....	43
3.2.8 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	46
4. REZULTATI	47
4.1 OPĆI PODACI O ISPITANICIMA KOJIMA JE UČINJENA IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA AKROLEINA U BIOPTATIMA KOŽE	47
4.2 KARAKTERISTIKE BOLESNIKA U FLORIDNOJ FAZI VASKULITISA (F).....	49
4.3 KARAKTERISTIKE BOLESNIKA U AKTIVNOJ FAZI VASKULITISA (A)	50
4.4 KARAKTERISTIKE BOLESNIKA U FAZI REGRESIJE VASKULITISA (R).....	50
4.5 KONTROLNA SKUPINA ISPITANIKA.....	51
4.6 EKSPRESIJA AKROLEINA U BIOPTATIMA KOŽE ZDRAVIH ISPITANIKA I BOLESNIKA S VASKULITISOM.....	52
4.7 OPĆI PODACI O PROSPEKTIVNIM BOLESNICIMA KOJIMA JE UČINJENA ANALIZA KONCENTRACIJE PEROKSIDA I ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA U SERUMU.....	58
4.8 ANALIZA VRIJEDNOSTI UPALNIH I BIOKEMIJSKIH PARAMETARA IZMEĐU PROSPEKTIVNIH BOLESNIKA S VMKŽ I ZDRAVIH ISPITANIKA	63
4.8.1 ANALIZIRANI UPALNI PARAMETRI POVEZANI S FAZOM AKTIVNOSTI VMKŽ	66
4.8.2 ANALIZIRANI BIOKEMIJSKI PARAMETRI POVEZANI S FAZOM AKTIVNOSTI VMKŽ KOJI UKAZUJU NA POREMEĆAJ BUBREŽNE FUNKCIJE	68
4.8.3 ANALIZIRANI BIOKEMIJSKI PARAMETRI POVEZANI S FAZOM AKTIVNOSTI VMKŽ KOJI UKAZUJU NA POREMEĆAJ METABOLIZMA ŽELJEZA.....	70
4.8.4 KORELACIJE MEĐU ANALIZIRANIM UPALNIM I BIOKEMIJSKIM PARAMETRIMA U BOLESNIKA S VMKŽ I ZDRAVIH ISPITANIKA.....	72
4.9 UKUPNI OKSIDACIJSKI KAPACITET (TOC) U BOLESNIKA S VMKŽ I ZDRAVIH ISPITANIKA	79
4.10 UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI KAPACITET (TAC) U BOLESNIKA S VMKŽ I ZDRAVIH ISPITANIKA ...	80
5. RASPRAVA.....	81
6. ZAKLJUČCI	97
7. LITERATURA	99
8. SAŽETAK	118
9. SUMMARY.....	119
10. ŽIVOTOPIS	120

POPIS OZNAKA I KRATICA (abecednim redom)

A - aktivna faza bolesti

ACR - od engl. *American College Rheumatology*

ALB - albumin

ALP - alkalna fosfataza

ALT- alanin-aminotransferaza

AMPK - AMP- aktivirana protein kinaza

AST - aspartat -aminotransferaza

ASTA - antistafilolizinski titar antitijela

AST-O - antistreptolizinski titar antitijela

Bazo aps - apsolutni bazofili

BIL uk. - ukupni bilirubin

BVAS - od engl. *Birmingham Vasculitis Activity Score*

cANCA - citoplazmatska antineutrofilna citoplazmatska antitijela

Ca - kalcij

CBAs - od engl. *chain – breaking – antioxidants*

CHCC - od engl. *Chapel Hill Consensus Conference*

CHCC1994 - od engl. *Chapel Hill Consensus Conference 1994.*

CHCC2012 - od engl. *Chapel Hill Consensus Conference 2012.*

CHOL - kolesterol

CK - kreatin kinaza

Cl - kloridi

CREAT - kreatinin

CRP - C- reaktivni protein

CSS - Churg Strauss sindrom

CTLA - od engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen*

DAB - 3,3'- diaminobenzidin-tetrahidroklorid

DIF - direktna imunofluorescencija

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

Eos aps. - apsolutni eozinofili

Er - eritrociti

F - floridna faza bolesti

Fe - željezo

GGT- gama glutamil transferaza

GPX - glutation peroksidaza

GRX - glutaredoksin

GSSG - oksidirani oblik glutationa

GSH - glutation

GST - glutation ó S transferaza

GST A4-4 - glutation ó S transferaza A 4-4

GUK - glukoza u krvi

HBV - Hepatitis B Virus

HCV - Hepatitis C Virus

HDL ó od engl. *High-Density Lipoprotein*

HE - hemalaun-eozin

Hgb - hemoglobin

HIV - od engl. Human Immunodeficiency Virus

HLA - od engl. *Human Leukocyte Antigen*

HNE - 4-hidroksi-2-nonenal

HSP - Henoch ó Schönlein purpura

Htc - hematokrit

HUVECs - od engl. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

ICAM - 1 - od engl. *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IFN - interferon gamma

IgA - imunoglobulin A

IgAV - imunoglobulin A vaskulitis

IgG - imunoglobulin G

IgM - imunoglobulin M

IK - imunokompleksi

IL - interleukin

IL-8 - interleukin ó 8

K - kalij

KKS - kompletna krvna slika

KLCA - kofni leukocitoklasti ni angiitis

KLCV - kofni leukocitoklasti ni vaskulitis

LCA - leukocitoklasti ni angitis

LCV - leukocitoklasti ni vaskulitis

LDH - laktat dehidrogenaza

LDL - od engl. *Low-Density Lipoprotein*

Leu - leukociti

Limfo aps - apsolutni limfociti

LPO - lipidna peroksidacija

MAPK - mitogen-aktivirana protein kinaza

MCH - od engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*

MCHC - od engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*

MCV - od engl. *Mean Corpuscular Volume*

MDA - malondialdehid

MHC - od engl. *Major Histocompatibility Complex*

Mono aps - apsolutni monociti

MPA - mikroskopski poliangitis

MPAB - mikroskopski poliangitis ograni en na bubrege

MPO - mijeloperoksidaza

MPV - od engl. *Mean Platelet Volume*

mRNA ó od engl. *messenger Ribonucleic Acid*

Na - natrij

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

Neut aps - apsolutni neutrofilni

NF B - od engl. *Nuclear Factor kappa B*

NK - od engl. *natural killer*

Nrfs ó od engl. *NF- E2 related factors*

PAECs ó od engl. *Porcine Aorta Endothelial Cells*

pANCA - perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska antitijela

PAS - Perjodna kiselina-Schiff reagens

PBS - od engl. *Phosphate Buffered Saline*

PHOS - fosfati

PUFA - od engl. *Poly Unsaturated Fatty Acids*

R - faza regresije

RDW - od engl. *Red Cell Distribution Width*

RF - reumatoidni faktor

ROS - od engl. *Reactive Oxygen Species*

SE - sedimentacija eritrocita

sil-2R - solubilni IL-2 receptor

SOD - superoksid dismutaza

SOV - od engl. *Single - Organ Vasculitis*

TAC - od engl. *Total Antioxidative Capacity*

TBS - Tris fosfatni pufer

TIBC - od engl. *Total Iron Binding Capacity*

TMB - tetrametilbenzidin

TNF - od engl. *Tumor Necrosis Factor* alpha

TOC - od engl. *Total Oxidative Capacity*

Trc - trombociti

Treg - T regulacijske stanice

TRIG - trigliceridi

TRX ó tioredoksin

UIBC ó od engl. *Unsaturated Iron Binding Capacity*

UK. PROT - ukupni proteini

UV- od engl. ultraviolet

VJO ó vaskulitis jednog organa

VKfiPV ó vaskulitis krvnih ffila promjenjive veli ine

VMKfi ó vaskulitis malih krvnih ffila

VNR - vinorelbin tartarat

VSVKfi ó vaskulitis srednje velikih krvnih ffila

vs. ó od lat. *versus*

VVKfi ó vaskulitis velikih krvnih ffila

WG ó Wegenerova granulomatoza

γ HV68 ó *gamma Herpes Virus 68*

² test - hi kvadrat test

1. UVOD

1.1 VASKULITIS

Vaskulitis je upala stijenke krvnih žila koja za posljedicu ima oštećenje ili potpunu destrukciju stijenke, krvarenje i/ili ishemiju (1).

1.1.1 VASKULITIS U KOŽI

Koža je kao najveći organ ljudskog tijela dobro opskrbljena krvnim žilama te je stoga često zahvaćena brojnim sindromima vaskulitisa. Vaskulitisi koji se pojavljuju u koži po opsegu variraju od dobro udno lokaliziranih do multiorganskih, brzoprogresivnih i po život opasnih oblika bolesti.

Najčešći oblik vaskulitisa u koži je leukocitoklastični angiitis (LCA) - simetrični purpurični egzantem uzrokovan oštećenjem malih krvnih žila, uglavnom kožnih kapilara i postkapilarnih venula (2). Sinonimi koji se vežu uz pojam LCA su: leukocitoklastični vaskulitis, alergijski vaskulitis, kožni nekrotizirajući i venulitis, hipersenzitivni angiitis, anafilaktoidna purpura, vaskulitis imunokompleksa (2). Iako bolest u koži dominantno zahvaća kapilare i venule, u hrvatskom dermatološkom krugu najčešće prihvaćen sinonim za LCA je leukocitoklastični vaskulitis (LCV) (2,3).

1.1.2 NOMENKLATURA I KLASIFIKACIJA VASKULITISA

Prema raspoloživim literaturnim podacima ne postoji idealan sistem klasifikacije bolesti.

Zeek (4) je prvi uveo klasifikaciju vaskulitisa razvrstavajući bolesnike u kategorije ovisno o vrsti organa zahvaćenog vaskulitisom (4). Ta početna shema je poslužila kao osnova za široko prihvaćen *American College Rheumatology* (ACR) sistem klasifikacije bolesti (5-12). Zlatni standard u razvoju ACR klasifikacijskih kriterija bili su reumatološki kriteriji za postavljanje dijagnoze. Upravo zbog poteškoća u svrstavanju dermatoloških bolesnika s vaskulitisom u pojedine kategorije ACR sistema, navedeni sistem klasifikacije nije prihvaćen ni u dermatologiji (13). Osjetljivost ACR klasifikacijskih kriterija kreće se između 71% i 94%, a specifičnost od 87% do 92% (14,15). Prediktivna vrijednost ACR kriterija je mala, procjenjuje se između 17% i 29% (16).

Cilj prve meunarodne nomenklature sistemskih vaskulitisa - *International Chapel Hill Consensus Conference on the Nomenclature of Systemic Vasculitides* (CHCC1994) bio je postići i konsenzus u nomenklaturi najčešćih oblika vaskulitisa i definirati svaku od njih. Prema navedenoj klasifikaciji termin kofni leukocitoklastni angiitis (KLCA) je ograničen na vaskulitis u kofni, bez zahvaćanja krvnih žila bilo kojeg drugog organa (17). Uspjeh navedene klasifikacije bio je u usvajanju široko prihvaćenih imena i definicija. S obzirom na napredak u znanju i razumijevanju vaskulitisa, pojavila se nova revidirana *International Chapel Hill Consensus Conference* (CHCC2012), koja je poboljšala CHCC1994 nomenklaturu, promijenila neprimkladna imena i definicije te dodatno uvrstila kategorije vaskulitisa koje nisu prethodno bile uvrštene u CHCC1994 (Tablica 1) (18).

Tablica 1. Imena vaskulitisa prihvaćena prema revidiranoj meunarodnoj *Chapel Hill Consensus* konferenciji u nomenklaturi vaskulitisa iz 2012. Godine (izvor: Jennette JC et al. 2012. *revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. Arthritis Rheum* 2013;65:1-11.)

Vaskulitis velikih krvnih žila (VVKŽ)

Takayasu arteritis

Arteritis gigantskih stanica

Vaskulitis srednje velikih krvnih žila (VSVKŽ)

Nodozni poliarteritis

Kawasakijeva bolest

Vaskulitis malih krvnih žila (VMKŽ)

Vaskulitis povezan s ANCA (antineutrofilnim citoplazmatskim protutijelima)

Mikroskopski poliangitis

Granulomatoza s poliangitisom (Wegenerova granulomatoza)

Eozinofilna granulomatoza s poliangitisom (Churg-Strauss) (EGPA)

Vaskulitis malih krvnih žila povezan s imunokompleksima

Vaskulitis posredovan protutijelima na glomerularnu bazalnu membranu

Krioglobulinemijski vaskulitis

IgA vaskulitis s leukocitoklastičnim angiitisom

Hipokomplementemijski urtikarija vaskulitis (HUV) (anti C1q vaskulitis)

Vaskulitis krvnih žila promjenjive veličine (VKŽPV)

Behçetova bolest (BB)

Coganov sindrom (CS)

Vaskulitis jednog organa (VJO)

Kofni leukocitoklastični angiitis (KLCA)

Kofni arteritis

Primarni vaskulitis središnjeg živčanog sustava

Izolirani aortitis

Ostalo

Vaskulitis povezan sa sistemskom bolešću

Lupus vaskulitis

Reumatoidni vaskulitis

Sarkoidni vaskulitis

Ostalo

Vaskulitis povezan s mogućom etiologijom

Krioglobulinemijski vaskulitis povezan s hepatitisom C

Vaskulitis povezan s hepatitisom B

Aortitis povezan sa sifilisom

Vaskulitis imunokompleksa uzrokovan lijekom

Vaskulitis povezan s ANCA uzrokovan lijekom

Vaskulitis povezan sa zloćudnom bolešću

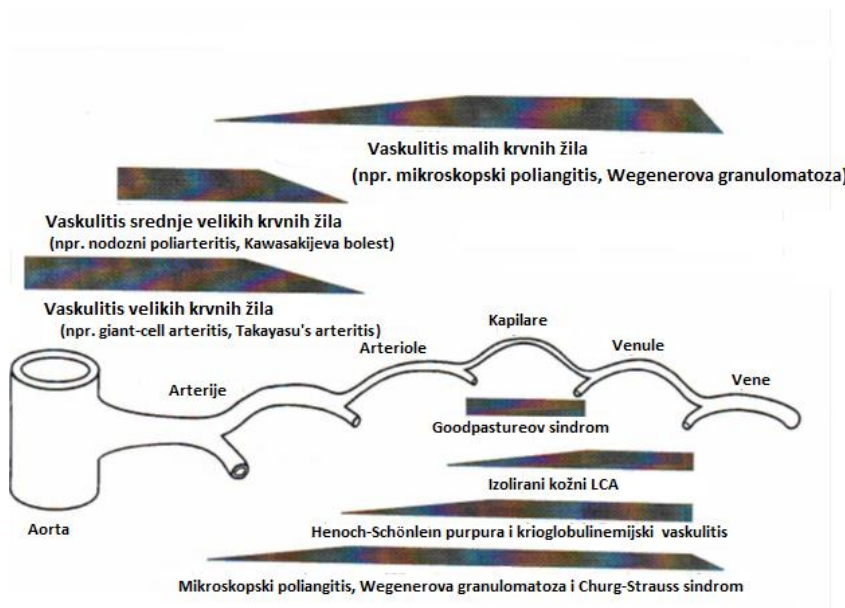
Ostalo

S obzirom na definiciju prema kojoj je vaskulitis upala stijenke krvne žile, upala je barem u nekom trenutku tijekom bolesti zajednička odrednica svih kategorija vaskulitisa. Odrednice koje variraju kod različitih oblika vaskulitisa i koriste se u kategorizaciji uključuju: etiologiju, patogenezu, tip zahvaćene krvne žile, tip upale (histološka podjela prema upalnom infiltratu), predilekcijsku organsku distribuciju, kliničke manifestacije, genetsku predispoziciju i određene demografske karakteristike (dob, spol, rasa, etnička i geografska distribucija) (18).

Ova je podjela vaskulitisa prema etiologiji bolesti. S obzirom na činjenicu da u mnogim slučajevima uzrok bolesti ostaje nepoznat, a isti etiološki mehanizam može uzrokovati različite kliničko-patološke ekspresije vaskulitisa (17,18) i ta se kategorizacija čini neprihvatljivom. Zbog toga, CHCC nomenklatura dijeli vaskulitise na temelju kombinacije karakteristika koji dijele različite oblike vaskulitisa u kategorije koje je moguće definirati (18).

Prva kategorizacijska razina temelji se na veličini krvnih žila koje su dominantno zahvaćene upalnim procesom (18). Takva podjela vaskulitisa uključuje tri kategorije (Slika 1):

1. vaskulitis velikih krvnih žila (VVKfi)
2. vaskulitis srednje velikih krvnih žila (VSVKfi)
3. vaskulitis malih krvnih žila (VMKfi)



Slika 1. Predilekcijski tip i veličina krvne žile kod pojedinih oblika vaskulitisa

Prema CHCC2012 nomenklaturi vaskulitisa (18) VMKfi je vaskulitis koji predominantno zahvaća male krvne žile, definirane kao male intraparenhimalne arterije, arteriole, kapilare i venule. Osim navedenih, zahvaćene mogu biti i srednje velike arterije i vene.

Single-organ vasculitis (SOV) ili vaskulitis jednog organa (VJO) je vaskulitis arterija i vena bilo koje veličine u pojedinom organu, bez karakteristika koje bi upućivale da se radi o ograničenoj ekspresiji sistemskog vaskulitisa. Prema CHCC2012 nomenklaturi (18) zahvaćeni organ i tip zahvaćene krvne žile sadržani su u nazivu vaskulitisa (npr. VMK i kofe), koji je predmet ovog istraživanja. CHCC2012 nomenklatura razdvaja KLCA i Henoch i Schönlein purpuru (HSP (imunoglobulin A ili IgA vaskulitis) u dvije zasebne kategorije.

Prema navedenoj nomenklaturi (18) distribucija vaskulitisa jednog organa može biti unifokalna i multifokalna (difuzna) unutar jednog organa ili organskog sustava. Međutim, neki bolesnici kojima je primarno dijagnosticiran VJO mogu u tijeku bolesti razviti određene manifestacije koje mogu zahtijevati reklasificiranje u sistemske oblike bolesti tj. u obje kategorije bolesti. Stoga se sa dermatološkog aspekta ni takva nomenklatura ne čini apsolutno razumljivom niti prihvatljivom.

CHCC je sustav nomenklature, a ne klasifikacijski niti dijagnostički sustav koji usmjerava klinički postupak s bolesnikom. Iako se histopatološki termini često koriste u definicijama, to ne znači da dijagnoza bolesti može biti postavljena samo na temelju patohistološkog nalaza u uzorku tkiva.

1.1.3 EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA VASKULITISA

Kofni i sistemski vaskulitisi su relativno rijetki, a pouzdani epidemiološki podaci su ograničeni. Budući da se definicije različitih oblika vaskulitisa mijenjaju (17,18) i epidemiološki podaci variraju ovisno o nomenklaturi i definicijama koje se trenutno koriste. Stoga niti točna incidencija kofnog vaskulitisa nije poznata.

Prema literaturnim podacima incidencija kofnog vaskulitisa kreće se u rasponu od 15.4-29.7 slučajeva na milijun godišnje (1). Watts i suradnici (19) su objavili studiju o bolesnicima kojima je biopsijom kofe potvrđen vaskulitis u kofu u razdoblju od siječnja 1990. i prosinca 1994., kojom je incidencija KLCA procijenjena na 38.6 slučajeva na milijun godišnje. Incidencija je bila veća u žena (50.4 na milijun) nego u muškaraca (26.0 na milijun) (19). Prema CHCC incidencija KLCA je 15.4 slučajeva na milijun godišnje (17,18). Studije iz Engleske, Španjolske i Skandinavije pokazuju da je godišnja incidencija primarnog vaskulitisa otprilike 20 slučajeva na milijun godišnje (20,21,22). Smatra se da se vaskulitis češće pojavljuje u bijelaca u odnosu na druge rase (e-medicine).

Op enito se smatra da ne postoji dobna niti spolna predilekcija za vaskulitis, a e- e se pojavljuje s napredovanjem flivotne dobi (2). Iako poga a sve dobne skupine, e- e se pojavljuje u odraslih nego u djece (koja u 90% slu ajeva imaju HSP) (1). HSP se naj e- e pojavljuje u dobi od 4 do 11 godina, sa predominacijom dje aka u odnosu na djevoj ice u omjeru 2:1, dok je u odrasloj dobi omjer izme u pojavnosti HSP u mu-karaca i flena obrnut (2).

Prema izvje-tajima iz literature srednja flivotna dob za pojavu vaskulitisa u odraslih je 47 godina, a u dje joj dobi 7 godina (23). Scott i Watts su u svojoj studiji pokazali da je incidencija vi-a u grupi ispitanika izme u 65 i 74 godine (24), dok su Tidman i sur. zabiljeffili maksimalnu incidenciju u mu-karaca u dobnoj skupini od 55 do 64 godine (22). Trajanje bolesti kre e se u rasponu od tjedan dana do 318 mjeseci (25). Prosje no trajanje kofnih promjena histolo-ki dijagnosticiranih kao LCV je oko 28 mjeseci, a vi-e od jedne tre ine tih bolesnika moffe imati kofne manifestacije bolesti vi-e od 3 godine (25). Ve ina bolesnika s KLCA ima jednu epizodu bolesti koja spontano prolazi unutar nekoliko tjedana ili mjeseci (26), a manje od 20% bolesnika s kofnim vaskulitisom e imati ekstrakutani (visceralni) vaskulitis (1).

Fatalni ishod pojavljuje se u manjine bolesnika, a prema literaturnim podacima se procjenjuje na oko 4% (23).

To an mehanizam koji dovodi do o-te enja krvne flile nije sasvim jasan u svih oblika VMKfi.

VMKfi kofle moffe biti primarni (idiopatski) proces bez poznatog uzroka ili sekundarni poreme aj povezan s uzimanjem nekih lijekova, pridruflenom infekcijom, sistemskom bolesti vezivnog tkiva ili zlo udnom bole- u (Tablica 2) (2,23). Op enito je prihva eno da se u 50% slu ajeva radi o idiopatskom poreme aju, a preostalih 50% o sekundarnom poreme aju (2).

Velik broj kontroliranih klini kih studija uglavnom odraslih bolesnika, kojima je biopsijom potvr en vaskulitis kofle pokazuju -irok raspon varijabilnosti u u estalosti i incidenciji pridruflenih stanja povezanih s pojavom vaskulitisa (27-44).

Tablica 2. Naj e– i okida i VMKfi (izvor: Braun Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W.H.C. Dermatology. Second completely revised edition. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 2000. p.905.)

Tip okidača	Primjeri
Infekcije	
Virusi	<i>Hepatitis B</i> <i>Hepatitis C</i> <i>Herpes simplex</i> <i>Dengue</i> <i>Cytomegalovirus</i> <i>Coxsackie</i>
Bakterije	<i>Streptococci</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium leprae</i>
Gljive	<i>Candida albicans</i> <i>Dermatophytes</i> (id reakcija)
Protozoe	<i>Trypanosoma</i> <i>Plasmodium falciparum</i> (malarija)
Crvi	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Onchocerca volvulus</i> <i>Schistosomes</i>
Zloćudne bolesti	limfomi, leukemije gamopatije, krioglobulinemija solidni tumori
Autoimune bolesti	<i>Lupus erythematosus</i> Reumatoidni artritis Sistemska skleroza Dermatomiozitis Upalne bolesti crijeva
Lijekovi	penicilini sulfonamidi alopurinol tiazidi, itd.
Hrana	boje konzervansi prirodni salicilati

Osim navedenih etioloških i geografskih imbenika, epidemiološke studije vaskulitisa uzimaju u obzir i genetske imbenike i imbenike okoliša kao povećani rizik u nastanku bolesti (45).

Razlike u glavnom kompleksu tkivne podudarnosti - MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*) i polimorfizmu citokina spominju se kao razlike za prijemivost i težinu pojedinih oblika vaskulitisa. HSP je povezana s HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) DRB*01 u sjeverozapadnoj Tjanjolskoj (46), a polimorfizam ICAM (engl. *Intercellular Adhesion Molecule*) -1 i IL (interleukin)-Ra gena se smatra za čimbenikom od gastrointestinalnih komplikacija (47) i čimbenikom kontrole imunološkog odgovora (48).

Lijekom uzrokovan LCA je najčešći i oblik izoliranog KLCA (23). Lijekovi uzrokuju otprilike 10% vaskulitisa u obliku lezija kofle. Promjene na kofli u smislu LCA induciranog lijekom pojavljuju se unutar 7-21 dan od primjene lijeka. Najčešće se radi o slijedećim lijekovima: penicilini, aminopenicilini, sulfonamidi, alopurinol, tiazidi, pirazoloni, retinoidi, kinoloni, hidatoini i proptiltiouracil (23).

S obzirom na čestu izloženost potencijalnim navedenim okidačima bolesti kao što su infekcije ili uzimanje određenih lijekova, može se zaključiti da je koflni vaskulitis relativno rijetka bolest (23). Isto tako se može zaključiti da je vaskulitis relativno rijetka bolest sve dok se upala u aterosklerotski promijenjenim filama i u rupturiranim plakovima filane ne klasificira kao vaskulitis (49).

1.1.4 KLINIČKA SLIKA VASKULITISA MALIH KRVNIH ŽILA (VMKŽ)

Znakovi i simptomi VMKfi su vrlo različiti, a mogu biti zajednički brojnim oblicima VMKfi. Prodromalni znakovi i simptomi kao što su vrućica, mijalgije, artralgijske, gubitak tjelesne težine i opće loše osjećanje često prate koflni vaskulitisa sindrome malih krvnih filane (1,50). Mnogi bolesnici na početku bolesti opisuju simptome nalik gripici. Artralgijske su migrirajućeg tipa te pogađaju male i velike zglobove, a sinovitis je prisutan u oko 10-20% oboljelih (50).

Lokalizirani oblici VMKfi mogu biti prvi znak ozbiljne, multisistemske bolesti. Često su zahvaćene krvne file kofle, respiratornog sustava, bubrega, crijeva, perifernih živaca, mišićno-kožnog sustava, oka, uha, grla i nosa, a u težinu zahvaćanja pojedinih organa je različita kod različitih tipova VMKfi (50).

S obzirom da su u sistemskim oblicima bolesti najčešće zahvaćeni bubrezi i gastrointestinalni sustav, sve bolesnike s KLCA potrebno je dijagnostički evaluirati u smislu zahvaćenosti tih

organa (pojava krvi u mokraći, bolovi u trbuhu, pojava krvi u stolici) (2). Osim toga, mogu biti zahvaćene male krvne žile pluća, srca i središnjeg živčanog sustava (3).

Ukoliko se pak radi o sekundarnom kožnom obliku vaskulitisa u sklopu neke sistemske bolesti, po etak simptoma sistemske bolesti može varirati, od nekoliko dana do nekoliko godina, sa prosjekom 6 mjeseci nakon pojave znakova vaskulitisa u koži (1,23).

HSP, najčešći sistemski vaskulitis u djece (1,2,3,50), karakteriziran je odlaganjem imunokompleksa tipa IgA i zahvaćanje venule, kapilare i arteriole. Najčešće kliničke manifestacije su purpura, artralgijski i grčeviti bolovi u trbuhu. Otprilike u polovine bolesnika pojavljuju se hematurija i proteinurija. Brzoprogresivno zatajenje bubrega, plućna bolest i periferna neuropatija su rijetke. Samo 10-20% bolesnika ima renalnu insuficijenciju (50).

1.1.4.1 KLINIČKA SLIKA KOŽNOG LEUKOCITOKLASTIČNOG ANGIITISA (KLCA)

Klinički nalazi LCA u koži su varijabilni i mogu se brzo mijenjati (2,50). Gotovo sve vaskulitične erupcije su simetrične i najčešće zahvaćaju donje udove (Slika 2) (1,2,50). Gornji udovi, trup, glava i vrat su rijetko zahvaćeni, a njihova zahvaćenost obično upućuje na ozbiljniju bolest ili prisutan sistemski oblik bolesti (Slike 3 i 4) (1). Često su im pridruženi otok i bolnost (2). Krvarenje je uvijek prisutno, iako može varirati u intenzitetu ovisno o lokalizaciji i veličini zahvaćenih krvnih žila (2). Dijaskopijom promjene ne blijede i ne nestaju, a *Rumpel-Leede* test je često pozitivan (2). Sluznice nisu zahvaćene (2). Tip promjene na koži blisko korelira sa veličinom zahvaćenih krvnih žila u koži i potkožju (1).

Najčešći nalaz na koži u bolesnika s LCA je palpabilna purpura, ponekad sa blagom flaričnom nekrozom i ulceracijom (Slika 2) (2,3,50).



Slika 2. Karakteristična najčešća lokalizacija vaskulitisa na donjim udovima (fotografija Interdisciplinarnog tima za vaskulitise KB Dubrava Zagreb)



Slika 3. Zahva enost gornjih udova vaskulitisom upu uje na ozbiljniji oblik bolesti (fotografija Interdisciplinarnog tima za vaskulitise KB Dubrava Zagreb)



Slika 4. Generalizacija vaskulitisa po kofli trupa (fotografija Interdisciplinarnog tima za vaskulitise KB Dubrava Zagreb)

Rane lezije su purpuri ne makule (slika 5) koje se pove avaju do veli ine od nekoliko centimetara u promjeru (2).



Slika 5. KLCA ó konfluiraju e purpuri ne makule (fotografija s postera autora Bacalja J, Bulimba-i S, Sredoja Ti-ma V, Ti-ljar M, Gale-i K, Gale-i Ljubanovi D, Kriflanac TM Skin and renal manifestations of pauci-immune small-vessel vasculitis. 22. Ljudevit Jurak International symposium of comparative pathology. Zagreb, Croatia. June 3-4,2011.)

Kako bolest napreduje pojavljuju se nove promjene na kofli, dok starije promjene po inju blijediti, s tipi nom promjenom boje poput hematoma u regresiji (2). Dakle, u istog bolesnika promjene na kofli mogu biti i polimorfne i prisutne u razli itim razvojnim stadijima, -to je

potrebno uzeti u obzir kod uzimanja biopti kog uzorka kofle, pri emu je potrebno uzeti svjeflu promjenu.

Ipak, 40% svih KLCA se pojavljuje kao mno-tvo palpabilnih purpuri nih lezija na donjim udovima, koje se pojavljuju i razvijaju relativno sinkrono (23).

Drugi oblici LCA u kofli uklju uju hemoragi ne papule, noduse, vezikule, bule i nekrozu (Slika 6) (2,3).



Slika 6. KLCA – hemoragi no - nekroti ne promjene (fotografija s postera autora Bacalja J, Bulimba-i S, Sredoja Ti-ma V, Ti-ljar M, Gale-i K, Gale-i Ljubanovi D, Kriflanac TM Skin and renal manifestations of pauci-immune small-vessel vasculitis. 22. Ljudevit Jurak International symposium of comparative pathology. Zagreb, Croatia. June 3-4,2011.)

1.1.4.2 KLINIČKO - PATOLOŠKA KORELACIJA VMKŽ U KOŽI

Zahva anje malih povr-inskih krvnih fiila rezultira purpuri nim makulama i infiltriranim eritemom (1). Zahva anje malih krvnih fiila dubljeg dermisa korelira s palpabilnom purpuirom i/ili vezikulobuloznim promjenama (1). Ulkusi, noduli, ofiljne promjene i livedo reticularis povezani su sa zahva anjem arterija mi-i a na koflno-potkoffnoj granici ili unutar potkoffja (1). Bolesnici s Wegenerovom granulomatozom i Churg-Strausovim sindromom tako er mogu imati nodule na kofli uzrokovane granulomatoznom upalom (50). Povr-inski perivaskularni neutrofilni infiltrati povezani s nuklearnim debrisom i ekstravazacijom eritrocita rezultiraju urtikarijskim papulama i plakovima (1). Urtikarija moffe biti manifestacija VMKfi, posebno ako se radi o depozitu imunokompleksa sa jakom aktivacijom komplementa. Za razliku od nevaskuliti ne alergijske urtikarije, lezije kod urtikarija vaskulitisa traju dulje od 24 sata, mogu postati purpuri ne i biti pra ene hipokomplementemijom (1,2,3,50).

1.1.5 ULOGA BIOPSIJE KOŽE U DIJAGNOSTICI VMKŽ

S obzirom da samo pojedini oblici vaskulitisa imaju patognomoni ni klini ki, radiografski i/ili laboratorijski nalaz, prava i pouzdana dijagnoza vaskulitisa zahtijeva histolo–ku potvrdu. Stoga je u klini koj evaluaciji bolesnika s vaskulitisom nuflna pretraga biopsija, kojom se potvr uje dijagnoza i upotpunjuje klasifikacija bolesti sukladno specifi nostima histolo–kog nalaza. Prema histolo–kom nalazu i tipu upalnog infiltrata razlikujemo nekoliko tipova vaskulitisa kofe (Tablica 3).

Tablica 3. Klasifikacija vaskulitisa kofle prema tipu upalnog infiltrata u histolo–kom nalazu (izvor: Braun Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W.H.C. Dermatology. Second completely revisted edition. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 2000. p.895.

Histološka slika	Primjer vaskulitisa
Leukocitoklastični	leukocitoklasti ni angiitis Henoch-Schönlein (IgAV)
Limfocitarni	vaskulitis u sklopu sistemske bolesti vezivnog tkiva lijekom uzrokovan vaskulitis
Granulomatozni	Wegenerova granulomatoza Churg óStrauss sindrom
Gigantske stanice	Temporalni arteritis Takayasu arteritis

Me utim, za postavljanje specifi ne dijagnoze, patohistolo–ka dijagnoza vaskulitisa nije dostatna sama za sebe, ve ju je nuflno korelirati sa anamnesti kim, klini kim, laboratorijskim i/ili angiografskim nalazima.

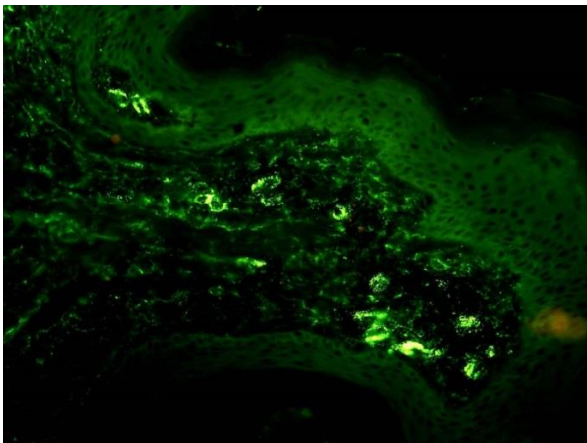
Karakteristi na akutna lezija LCA zahva a dermalne postkapilarne venule. Upravo ta lezija je histolo–ki identi na dermalnoj leziji koja se pojavljuje kao komponenta sistemskih VMKfi (51).

Odgovaraju i klini ki izbor lezije za biopsiju i patolo–ki pristup imaju velik utjecaj na postavljanje dijagnoze. Nuflno je pravilno uzeti biopsiju kofle do subkutisa, sa najizraflenije, najinfiltriranije purpuri ne promjene na kofli. Mali biopti ki uzorci sadrfe samo male krvne ffile, tako da su i najve e arterije u takvim uzorcima male arterije.

Optimalno vrijeme uzimanja biopsije kofle je unutar 48 sati od pojave vaskulitisa i lezije. Ako je biopsija kofle vremenski loše planirana u odnosu na pojavu promjene na kofli, patohistološke značajke vaskulitisa mogu biti odsutne i ta se činjenica mora uzeti u obzir kod negativne kliničko-histološke korelacije u bolesnika. Čiji klinički nalaz upućuje na vaskulitis (1). Purpurna lezija biopsirane u prvih 24 sata su karakterizirane depozitima fibrina unutar zida krvne žile, krvarenjem i nuklearnim debrisom. Nakon 24 sata, neutrofile postupno zamjenjuju limfociti i makrofagi. Zbog toga biopsije lezija starijih od 48 sati mogu pokazivati infiltrat bogat limfocitima.

U slučaju da se radi o biopsiji lezija u smislu *livedo racemosa*, potrebno je uzeti duboku biopsiju do potkrovnog masnog tkiva sa središnjeg bijelog areala, jer su upravo na tom mjestu lokalizirane stenozne krvne žile. Ukoliko se radi o egzulceriranim lezijama, biopsat je potrebno uzeti sa neulcerirane kofle, jer se u dnu ulkusa često vide i incidentalni traumatski vaskulitis. Ukoliko se radi o površinskom ulkusu, savjetuje se biopsija s ruba. Ukoliko se radi o dubljim ulkusima, biopsija uključuje i središnji ulcerirani dio radi boljeg prepoznavanja arterijskog vaskulitisa.

Pretraga direktne imunofluorescencije (DIF) biopsata kofle pruža mogućnost dodatne dijagnostike, primjerice verifikacije IgA depozita u HSP (Slika 7).



Slika 7. Nalaz DIF pretrage o pozitivnom IgA u Henoch-Schönlein purpuri (IgAV), biopsija kofle u inženju unutar 48 sati od pojave purpurne promjene na kofli

Kao i kod svjetlosne mikroskopije i za DIF pretragu je potrebno biopsirati svježu leziju. U slučaju vaskulitisa posredovanog imunokompleksima (IK), u 100% biopsata može se IK vizualizirati u prvih 48 sati. 70% pozitivnih bit će ako je lezija uzeta između 48 i 72 sata, a

nakon 72 sata ne može se moći detektirati imunoglobulini (iako se komplement može detektirati i u 50% lezija starijih od 72 sata) (1).

1.1.6 DIJAGNOZA I LIJEČENJE VMKŽ

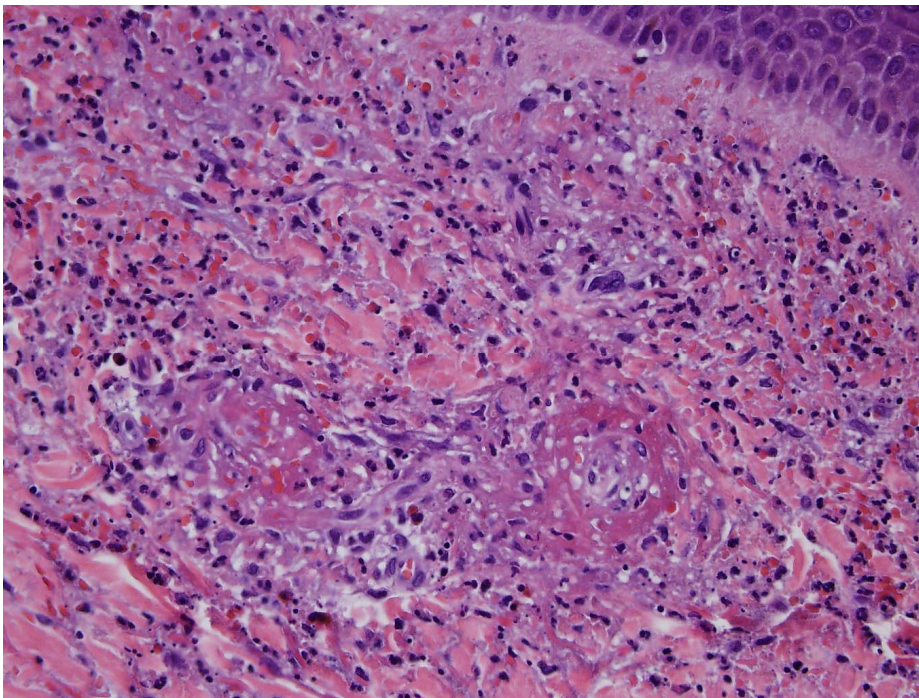
Prvi korak u dijagnozi je prepoznati da se radi o VMKfi, a drugi teži korak je odrediti specifični tip bolesti. Pravodobna dijagnoza je važna, jer pojedini oblici VMKfi mogu imati lošu prognozu.

Dijagnostička obrada bolesnika s VMKfi ima dva glavna cilja. Prvi cilj je određivanje prisutnosti sistemske bolesti. Palpabilna purpura može biti prvi klinički znak rizika za razvoj po život opasnih komplikacija kao što su alveolarno krvarenje, brzo progresivni glomerulonefritis ili *mononeuritis multiplex*. Smatra se da oko polovina bolesnika s KLCMA može imati zahvaćene bubrege (52). U određivanju prognoze bolesti važna je istražiti znakove i simptome visceralne ili generalizirane zahvaćenosti, u čemu pomaže BVAS - *Birmingham Vasculitis Activity Score*, koji može identificirati bolesnike sa prisutnom sistemskom bolešću (53). Drugi cilj je identifikacija pridružene bolesti, što pomaže i u predviđanju prognoze. Detaljna anamneza o mogućim okidačima bolesti (tablica 2.) i detaljan klinički pregled pomažu u odabiru odgovarajućih pretraga, u cilju određivanja eventualnih sistemskih znakova bolesti ili postojanja pridružene bolesti. Razumna rutinska dijagnostička obrada KLCMA, kao najčešćeg oblika VMKfi u odraslih osoba uključuje: kompletnu krvnu sliku (KKS), sedimentaciju eritrocita (SE), C - reaktivni protein (CRP), koagulogram, jetrene enzime (aspartat-aminotransferazu (AST), alanin aminotransferazu (ALT), gama glutamil transferazu (GGT), parametre funkcije bubrega (urea, kreatinin), analizu urina, pretragu stolice na okultno krvarenje, antistreptolizinski titar antitijela (AST-O), antistafilolizinski titar antitijela (ASTA), citoplazmatska antineutrofilna citoplazmatska antitijela (cANCA), perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska antitijela (pANCA), reumatoidni faktor (RF), razinu ukupnog komplementa, C3 i C4, elektroforezu serumskih proteina, krioglobuline, i markere *hepatitisa B i C*. Rendgenska snimka srca i pluća dio je rutinske dijagnostičke obrade. Bolesnicima s sumnjom na srcu potrebno je učiniti ultrazvuk srca i hemokulturu. *HIV* test treba učiniti svim bolesnicima kojima se ne zna uzrok vaskulitisa ili koji imaju povećani rizik prema anamnezi i kliničkom statusu. Ako nalaz razmaza periferne krvi odstupa od normale, potrebno je učiniti biopsiju koštane srži. Ostale pretrage potrebno je učiniti sukladno prisutnim znacima i simptomima bolesti, kako nam ne bi promakla osnovna bolest ili sistemski vaskulitis. Oko testiranja na zloćudne bolesti postoje kontradikcije.

Općenito, postoji konsenzus da je tumorske markere potrebno uiniti ukoliko postoje sugestivni simptomi i znakovi koji upućuju na postojanje eventualne zloćudne bolesti.

Biopsija kože je zlatni standard postavljanja dijagnoze vaskulitisa kože, ali i za detekciju ICDIF pretragom (Slika 7) (54).

Histološki nalaz kožnog leukocitoklastičnog vaskulitisa (KLCV), najčešćeg tipa vaskulitisa kože, pokazuje oštećenje malih krvnih žila papilarnog dermisa. Histološki se na hemalaun-eozin obojenim rezovima opaža suženje lumena i nabubrene endotelne stanice u zahvaćenim krvnim žilama. Stijenke tih žila zadebljane su, a u njima se vidi fibrinoidna nekroza i infiltracija neutrofilnim leukocitima s karioreksom (*nuclear dust*) (3). Histološki se obično nalazi egzocitoza eritrocita, nakupljanje neutrofila sa nuklearnim debrisom (leukocitoklazija), depoziti fibrina u stijenci žile i fibrinoidna nekroza dermisa (Slika 8) (2). Fibrinoidna nekroza (depoziti fibrina unutar i oko stijenke krvne žile) je čest histološki nalaz u gotovo svim ranih vaskulitih lezijama (Slika 8), a nastaje zbog akumulacije plazmatskih proteina, uključujući i faktore koagulacije koji se pretvaraju u fibrin na mjestu destrukcije stijenke krvne žile (55).



Slika 8. Histološki nalaz KLCV - fibrinoidna nekroza i obilna leukocitoklazija HE400x

U ranijim lezijama mogu biti dominantni limfociti uz malu destrukciju krvnih žila, a kasnije lezije mogu pokazivati nekrozu (2).

Nakon što se biopsijom u patohistološkom nalazu potvrdi dijagnoza vaskulitisa, potrebno je pokušati utvrditi uzrok bolesti. Ukoliko se utvrdi okidač, liječenje treba biti usmjereno na njegovo uklanjanje (npr. izostavljanje određenog lijeka ili liječenje infekcije), što će dovesti i do regresije bolesti. U slučaju pridružene sistemske ili zloćudne bolesti, liječenje treba biti usmjereno na osnovnu bolest.

Ukoliko nisu prisutni znaci sistemskog vaskulitisa, liječenje je najčešće simptomatsko. S dermatološkog aspekta glavni razlog liječenja lakših oblika KLCA je olakšati bolesniku tegobe. Za ozbiljnije oblike bolesti cilj liječenja je prevencija opsefnih ulceracija, infarkcija i posljedica koje mogu biti trajnih oštećenja kože i potkožnih tkiva.

Bolesnici osjećaju olakšanje simptoma nakon mirovanja u krevetu uz elevaciju nogu i kompresivne zavojice. Lokalno se mogu primijeniti visokopotentni kortikosteroidni pripravci pod okluzijom (2,3). Antihistaminici i nesteroidni protuupalni lijekovi pomažu u ublažavanju kožnih simptoma te artralgija i mialgija (50), iako se nesteroidni protuupalni lijekovi ne smiju zaboraviti niti kao mogući okidač bolesti (2,3). Ozbiljnije kožne lezije mogu zahtijevati i sistemsku kortikosteroidnu terapiju (2,3,50).

Ukoliko se s vremenom razviju sistemski znakovi i simptomi bolesti, terapija se prilagođava ovisno o kojem se tipu sistemskog vaskulitisa radi (51). Bolesnici sa ozbiljnim visceralnim komplikacijama mogu zahtijevati više doze kortikosteroida (1-2 mg/kg tjelesne težine) sa ili bez kombinacije s imunosupresivnim lijekovima (ciklofosamid, azatioprin, metotreksat, mikofenolat-mofetil). U obzir dolaze plazmafereza (2) i biološki lijekovi. Rituximab se uinkovito primjenjuje u bolesnika s ANCA povezanim vaskulitisima te u kroničnim kožnim VMKf.

Rana dijagnoza zahvaćenosti unutrašnjih organa VMKf i odgovarajuća promptna terapija mogu pomoći u zaštiti ili ublažiti oštećenje funkcije vitalnih organa (56). Ovakvim se pristupom sprejava preagresivno liječenje blagih oblika bolesti, odnosno neodgovarajuće, subdozirano liječenje potencijalno životno ugroženih bolesnika (50).

1.1.7 TIJEK BOLESTI I PROGNOZA

U VMKf postoje tri moguća tijeka bolesti:

1. jedna akutna samoograničavajuća epizoda koja se obično povlači unutar 6 mjeseci, obično povezana s lijekom ili infekcijom kao okidačem bolesti (otprilike 60% svih VMKf) (1);

2. bolest u kojoj se izmjenjuju periodi pogoravanja i poboljšanja, najčešće povezana s HSP i krioglobulinemijom (oko 20% svih VMKfi) (1);

3. bolest kroničnog tijeka, povezana s primarnim sistemskim vaskulitisom, sistemskom bolešću u vezivnog tkiva (uključujući i krioglobulinemiju) i zloćudnom bolešću (oko 20% VMKfi) (1).

Prognoza vaskulitisa malih krvnih žila u kožnim manifestacijama variraju od dobroćudne kratkotrajne samoograničavajuće erupcije purpuri njihova promjena na koži do po život opasne bolesti sa posljednjim zatajenjem brojnih organa (54). Dijagnostičko razgraničavanje lokaliziranih kožnih nasuprot sistemskih vaskulitisa važno je zbog uvođenja odgovarajućeg liječenja i kliničkog praćenja (23).

U većine bolesnika VMKfi ima relativno dobro uklanjanje, samoograničavajuće i tijekom, posebno ako je bolest ograničena samo na kožu (50). U većine oboljelih bolest prolazi nakon uklanjanja prepoznatih okidača (2,3). Prema nekim literaturnim izvještajima se smatra da je sistemski bolest puno češća nego što se misli, osobito u bolesnika sa prominentnim kožnim simptomima. Tako je u studiji Ioannidou i sur. (52) u 43% bolesnika koji se prezentiraju sa KLCV utvrđena i zahvaćenost bubrega.

Identifikacija krioglobulina, artralgijske i normalne tjelesne temperature rizični su simptomi za kroničnu kožnu bolest (25). Prisutnost ulceracija u usporedbi sa palpabilnom purpurom također je prediktivna za perzistentnu i rekurentnu bolest (57). Rizikni simptomatski pokazatelji za sistemsku bolest uključuju parestezije, vrućicu i odsutnost bolnih promjena (25). Prisutnost nekroze kože upućuje na manifestaciju sistemske bolesti vezivnog tkiva ili primarni sistemski vaskulitis (19).

Histološki, tjelesna temperatura u KLCV korelira s kliničkom tjelesnom bolesti (57), a duboki dermalni i subkutani vaskulitis su povezani s malignom bolešću u sistemskom bolešću u vezivnog tkiva (58). Ipak, neke studije nisu pokazale značajnu korelaciju tjelesne histoloških promjena i sistemske bolesti sa ekstrakutanim komplikacijama (59). Nalaz lezionalnih IgA depozita DIF pretragom je prediktivna za zahvaćenost bubrega (60).

U slučaju postojanja kronične sistemske bolesti (npr. reumatoidnog artritisa), promjene su dugotrajne (2,3). U slučaju idiopatskih vaskulitisa (nepoznatih okidača bolesti) promjene na koži su kronično-recidivirajuće tijekom.

Neovisno o uzroku, u slučaju bolesti s ekstrakutanim komplikacijama kao što su oštećenje bubrega i gastrointestinalnog trakta, prognoza bolesti je ovisna o stupnju oštećenja tih organa (3).

1.1.8 PATOGENEZA I IMPLIKACIJA PATOGENEZE NA LIJEČENJE VASKULITISA

Pretpostavku da je individualni genetski defekt kritični element u nastanku određenog fenotipa vaskulitisa, potvrđuje mišji model infekcije *gamma herpesvirusom 68* (γ HV68). Fatalni oblik vaskulitisa u miševa, u slučaju navedene infekcije kao okidača bolesti, razvija se u slučaju nedostatka interferona (IFN) ili njegovih receptora. Ta studija pokazuje da je IFN nužan imbenik u kontroli kronične vaskularne patologije inducirane γ HV68 i sugerira *gamma herpesviruse* kao potencijalne etiološke imbenike u nastanku vaskulitisa u ljudi (61).

Citokinima posredovane proinflamatorne promjene u ekspresiji i funkciji adhezijskih molekula zajedno sa neodgovarajućom aktivacijom leukocita i endotelnih stanica smatraju se ključnim imbenicima koji utječu na upalu i oštećenje krvnih žila (3,62). Langerhasnove stanice i ostale dendritičke stanice mogu potaknuti imunološki vaskulitni odgovor promocijom adhezije i kontakta među stanicama (63).

Specifično mjesto i perzistencija vaskulitisa mogu biti povezane i s lokaliziranom endotelnom disfunkcijom posredovanom interakcijom između stromalnih stanica i endotela (64). Osim toga, upalom posredovana angiogeneza ili neovaskularizacija koja se nalazi u nekim oblicima kroničnog i sistemskog vaskulitisa može djelovati dvojako, kompenziraju i s jedne strane ishemiju, a s druge strane potiču i upalu i podržavaju i vaskulitis (65).

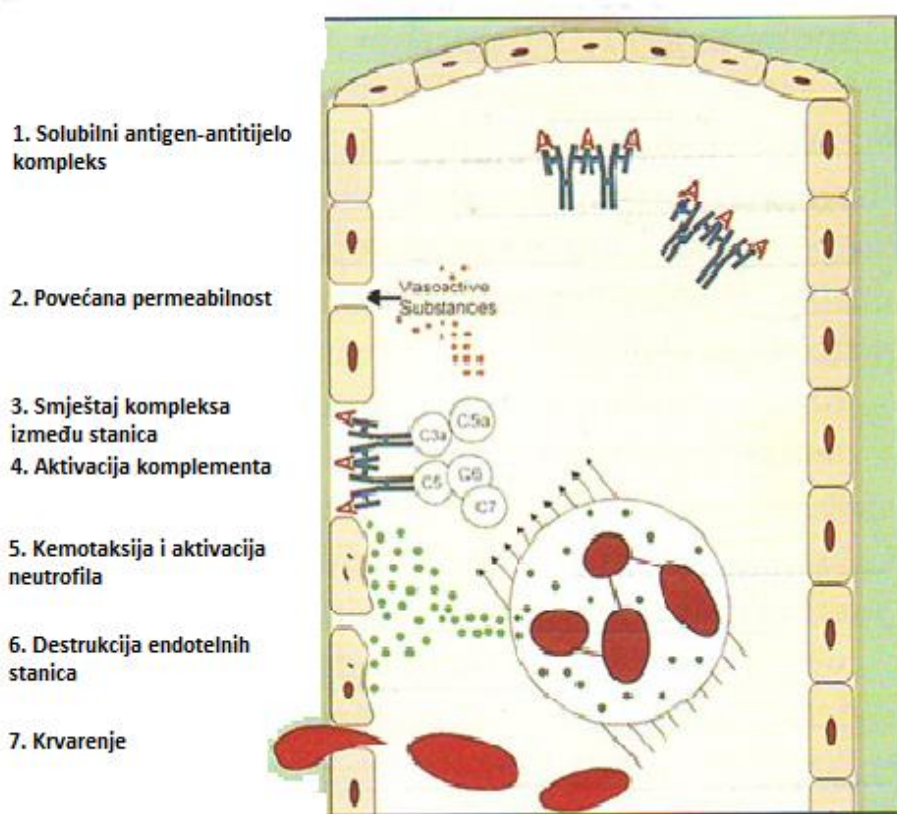
Mnogi različiti tipovi ozljede, uglavnom posredovani imunološki ili direktnim utjecajem infekcije, mogu uzrokovati identični odgovor u zidu krvne žile koji rezultira fibrinoidnom nekrozom. Jedan od razloga za takav jeest krajnji morfološki nalaz je da mnogi različiti patogeni mehanizmi dovode do aktivacije i abnormalne diapedeze neutrofila, dva ključna imbenika zajednička u patogenezi neutrofilima povezanim VMKfi. Zbunjujuća činjenica u evaluaciji patogenih mehanizama vaskulitisa je da interval između oštećenja krvne žile i klinički prepoznatljive vaskulitne promjene na koži može biti od nekoliko minuta do nekoliko dana. Za to vrijeme različiti odgovori mogu smanjiti, povećati ili modificirati krvofilni odgovor (66). Karakteristike početnog oštećenja mogu se takvim modifikacijama izgubiti, zbog čega se aktivna akutna upalna promjena može promijeniti u stariju, esto

skleroti nu leziju sa predominacijom T limfocita i makrofaga (62). Upravo stoga se za biopsiju mora izabrati svježa promjena, ne starija više od 12 do 48 sati, kako bi se eventualno uspio utvrditi primarni patogeni događaj. Iako se u patogenezi vaskulitisa spominju i neimunološki imbenici (kao npr. infekcije koje dovode do direktnog oštećenja endotelne stanice), ipak je većina vaskulitisa promjena povezana s imunopatogenetskim mehanizmima. Ti se mehanizmi mogu klasificirati u četiri osnovna tipa imunoloških reakcija preosjetljivosti prema Coombsu i Gellu (67). Tako se razlikuju alergijski vaskulitis, protutijelima posredovan vaskulitis, vaskulitis posredovan IK i T-stanicama posredovan hipersenzitivni vaskulitis. Osim toga, i drugi imunopatološki mehanizmi, kao što su neutralizacija protutijela, granulomatozna upala uzrokovana neimunološkim imbenicima i T stanicama posredovane citotoksične reakcije mogu uzrokovati neke oblike vaskulitisa (68).

U ovom modelu serumske bolesti, ponavljane injekcije heterolognih proteina rezultiraju antigen - protutijelo kompleksima (IK) i vaskulitisom, ako je antigena u suvišku (69). Depoziti IK rezultiraju aktivacijom komplementa i otpuštanjem anafilatoksina C3a i C5a koji nova i upalne stanice (70). Akumulacija neutrofila i mastocita je potrebna za progresiju IK posredovanog oštećenja krvne žile (71,72). Infiltracija stijenke krvne žile i posljedno oštećenje krvne žile povezano s IK posredovanim vaskulitisom su u značajnoj mjeri regulirane adhezijskim molekulama (73,74,75). Odsutnost intracelularnih adhezijskih molekula 1 (ICAM 1), P-selektina, E -selektina i/ili P-selektin liganda vodi do značajnog smanjenja infiltracije neutrofila, edema i krvarenja. U ljudi, ekspresija tih adhezijskih molekula je dokazana na mjestima vaskulitisa (76). Indukcija tih adhezijskih molekula može se pojaviti zbog aktivacije komponentne komplementa (C1q) i citokina (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, *tumor necrosis factor* α (TNF) i IFN), koje produciraju limfociti i makrofagi (77).

U većini oblika kroničnog vaskulitisa DIF pretragom se nalaze depoziti imunoglobulina (IgM, IgA, IgG) i/ili komplementa (C3) (prosječno 81%, raspon 58%-100%), impliciraju i ulogu IK u njihovoj patogenezi (25,60). Smatra se da su IK kod KLCAs tipično lokalizirani u postkapilarnim venulama koje su podložnije oštećenju stijenke zbog nižeg sadržaja kisika, sporijeg protoka krvi i staze (78,79). Depoziti IK dovode do ekspresije adhezijske molekule (npr. E-selektina) i aktivacije sustava komplementa sa aktivacijom C3a i C5a kemotaktičkih faktora koji privlače neutrofile i bazofile i odlaganje krajnjih komponenti komplementa (66,78). Adhezijske molekule stupaju u interakciju s neutrofilima, pri čemu neutrofili vrlo adheriraju za stijenku krvne žile te budu onemogućeni u svom izlasku izvan stijenke krvne žile. Otpuštanje proteolitičkih enzima, osobito kolagenaza i elastaza, zajedno s reaktivnim

kisikovim spojevima (ROS - engl. *Reactive Oxygen Species*) o-te uje zid krvne file i okolna tkiva (Slika 9). C5b-9, krajnji produkt aktivacije komplementa, utvr en je u 82% slu ajeva KLCA i 73% slu ajeva HSP, ime se indicira njegova zna ajna uloga u o-te enju endotelnih stanica u vaskulitisu posredovanom IK (80,81,82,83,84).



Slika 9. Patogeneza LCA (Braun Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W.H.C. *Dermatology*. Second completely revised edition. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 2000. p.905.)

Pove anje razumijevanja patogeneze vaskulitisa nuffno je u postizanju potencijalnih specifi nih ciljeva lije enja (šciljna terapija) i/ili pra enju imunolo-kog odgovora odgovornog za o-te enje stijenke krvne file (85,86,87). Saznanje da P-/E/L- selektini i P-selektin glikoprotein ligand reguliraju IK posredovan LCA omogu uje kao cilj blokiranje upalne kaskade i posljednog o-te enja tkiva. Bioprodukti aktivacije komplementa i komponenti komplementa su potencijalne mete za specifi ne lijekove koji djeluju na patogenetski mehanizam u zaustavljanju upalne kaskade kojom zapo inje vaskulitis (85).

Osim toga, kritični medijatori upale, kao što je TNF α kojeg stvaraju makrofagi, dovode do aktivacije endotelnih stanica sa ekspresijom adhezijskih molekula i daljnim otpuštanjem drugih proinflammatoryh citokina (IL-1, IL-6 i IL-8). Blokada TNF α provaskulitisa nogu u inkubaciji je korak u liječenju sistemskog vaskulitisa (88). Povišene razine IL-6 prema nekim literaturnim izvještajima mogu biti uključene u planiranje imunosupresivne terapije (89,90). Drugi terapijski ciljevi uključuju interferon- γ , metaloproteinaze matriksa, inhibitori rasta, vaskularni endotelni inhibitori rasta, ravnotežu IL-10/IL-12, antagoniste IL-1/IL-1 receptora, CTLA-4 i druge kostimulatorne molekule te ROS (23).

1.2 OKSIDACIJSKI STRES, REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI (ROS) I AKROLEIN (ACR)

Kisik je ubicvitaran element, nužan za oksidacijski metabolizam i u inkubaciji proizvodnju energije u mitohondriju svih aerobnih organizama. Upravo ta esencijalna potreba živih bića za kisikom zasjenjuje činjenicu da se istovremeno radi i o toksičnom plinu, čija prisutnost dovodi do pojave oksidacijskog stresa te da aerobi preživljavaju samo zbog razvijenih antioksidacijskih mehanizama zaštite (91,92).

Redukcijom jednog elektrona molekule kisika nastaje superoksid (O_2^-), koji u kiselj sredini veće proton pri čemu nastaje još reaktivniji perhidroksilni radikal (HO_2^-). Superoksid se spontano, ali i uz pomoć superoksid dismutaze (SOD) i vodikovih iona, raspada u vodikov peroksid (H_2O_2). Reakcijom vodikovog peroksida i superoksida uz prisustvo prijelaznih metala, Fe^{2+} i Cu^{2+} , kao katalizatora u Fentonovoj reakciji, nastaje izuzetno reaktivan hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$). Svi prethodno navedeni ROS su vrlo reaktivni te izazivaju oksidativno oštećenje struktura stanice (91). ROS osim kisikovih radikala, kao što su O_2^- i HO_2^- , uključuju i reaktivne spojeve kisika, kao što su H_2O_2 , reaktivni (singlet) kisik ($^1\text{O}_2$), ozon (O_3) te hipoklornu kiselinu (HOCl).

ROS se u organizmu neprestano stvaraju za vrijeme normalnih fizioloških, ali i patoloških metaboličkih procesa, tijekom redukcije i ekscitacije molekularnog kisika (93,94).

U normalnim se okolnostima stvaranje i uklanjanje ROS nalazi u dinamičkoj ravnoteži sa antioksidativnim mehanizmima organizma (95). Do pomaka ravnoteže mogu doći ako je smanjena antioksidativna zaštita organizma ili ako je pojačano stvaranje radikala. U

patolo-kim stanjima organizma dolazi do porasta aktivnosti slobodnih radikala. Ovaj događaj je posredovan ekstracelularnim otpu-tanjem ROS-a od strane granulocita, promjenom u transportnom lancu elektrona u mitohondrijima, aktivacijom ksantin oksidaze, aktivacijom fosfolipaze, itd. (96). Rezultat ovih aktivnosti je prekomjerno stvaranje ROS-a, savladavanje antioksidativne obrane i posljedice koje nastaju u stanici i tkiva (96). Ovakav poremećaj ravnoteže prooksidanasa i antioksidanasa u korist prooksidanasa definira se kao oksidacijski stres (97). U stanjima oksidacijskog stresa dolazi do porasta ROS-a u tkivima ili organizmu, što posljedice dovodi do porasta lipidne peroksidacije, denaturacije proteina/enzima i mutagenog oštećenja nukleinskih kiselina (96). Razmjernost oštećenja nastalog kao posljedica oksidacijskog stresa ovisi o njegovom stupnju i trajanju, mehanizmu kojim je izazvan te o vrsti zahvaćenog organskog sustava. Bitnu razliku između patološkog i fiziološkog oksidacijskog stresa čine posljedice na makromolekulama (bjelancevinama, nukleinskim kiselinama, ugljikohidratima i mastima), pojedinim stanicama, ali i organizmu u cjelini, obzirom da su prekomjerni. Oksidacijski stres izaziva oštećenje stanih struktura što na kraju dovodi do smrti stanice (96).

1.2.1 LIPIDNA PEROKSIDACIJA (LPO)

Oksidacijski stres, stanje prekomjernoga stvaranja reaktivnih kisikovih tvari, bitna je sastavnica različitih bolesti, ali i fizioloških procesa. Glavna je razlika između fiziološkog i patološkog oksidacijskog stresa pojava lipidne peroksidacije (LPO) i njenih završnih toksičnih produkata (98).

U sastavu lipida svih biomembrana nalaze se nezasićene masne kiseline (engl. *Poly Unsaturated Fatty Acid* - PUFA) koje su izrazito osjetljive na oštećenja uzrokovana reaktivnim kisikovim tvarima. LPO je složena lančana reakcija razgradnje (oksidacije) višestruko nezasićenih masnih kiselina potaknuta slobodnim kisikovim radikalima (99). U kontroliranim uvjetima se pod utjecajem enzima u stanicama proizvode oksidirani produkti PUFA, koji djeluju kao medijatori upale (100,101). Pojava LPO u biološkim membranama može dovesti do poremećaja funkcije i smanjene fluidnosti, što je povezano sa raznim bolestima kao što su npr. ishemijsko-reperfuzijska ozljeda, ateroskleroza, itd. (102).

Svi ROS nisu jednako reaktivni, a LPO iniciraju hidroksilni radikal ($\dot{\text{O}}\text{H}$), alkoksilni radikal ($\text{RO}\dot{\text{O}}$) i peroksilni radikal ($\text{ROO}\dot{\text{O}}$).

LPO započinje fazom inicijacije (103) u kojoj visokoreaktivni oksidans (X^{\bullet}) oduzima atom vodika višestruko nezasićenim masnoj kiselini, što dovodi do nastanka alkilnog odnosno lipidnog radikala. Ovaj proces se događa na vodikovom smješenom na α -metilen ugljiku. Svaki kemijski spoj koji ima sposobnost oduzimanja vodikovog atoma masnoj kiselini može izazvati ovaj proces. Među reaktivnim kisikovim radikalima, samo hidroksilni radikal ima dovoljnu energiju da izazove LPO (103,104). Veći je broj dvostrukih veza i bialilnih centara u masnoj kiselini, tim je lakše uklanjanje atoma vodika i započinjanje LPO.

Ukoliko inicijacija LPO nije kontrolirana obrambenim mehanizmima, može započeti lančanu reakciju koja može dovesti do uništenja okolnih molekula. Dakle, ako nema prisutnih antioksidanasa, doći će do faze propagacije i nastanka lančane reakcije LPO.

Završni produkti LPO su reaktivni aldehidi, kao što su akrolein (ACR), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) i malondialdehid (MDA), koji dovode do progresije oksidacijskog oštećenja, oštećenju stanice i uzrokuju staničnu smrt (105). Dugo vremena su reaktivni aldehidi (MDA, HNE i ACR) bili smatrani toksičnim završnim produktima LPO. Međutim danas je poznato da imaju stvarnu snažnu biološku ulogu u mnogobrojnim putevima prijenosa staničnih signala među brojnim patološkim i fiziološkim stanjima, uglavnom u regulaciji staničnog ciklusa.

Zbog svoje kemijske reaktivnosti, reaktivni aldehidi stvaraju kovalentne veze sa makromolekulama i vrše biološke učinke. Osim toga, služe i kao biomarkeri LPO/oksidacijskog stresa (106). Za razliku od reaktivnih slobodnih radikala, reaktivni aldehidi su relativno dugovijeka, a bitna im je osobitost da djeluju daleko od mjesta početnog nastanka (primjerice bioloških membrana), bilo ekstracelularno ili intracelularno (105). Povišena koncentracija završnih produkata LPO je evidentirana u najčešćih bolesti u ljudi. Unatoč tome što se oksidacijsko oštećenje pojavljuje u gotovo svim bolestima uvijek, ipak ima značajnu patološku ulogu samo u nekima od njih. Odnos između LPO i bolesti se stalno istražuje, a odnos između bioloških i kemijskih stanja LPO su kompleksni i još nedovoljno definirani (107,108,109).

Mnogi protokoli su dostupni za mjerenje LPO, ali ne postoji protokol kojim se može mjeriti cijeli proces (110).

1.2.2 ANTIOKSIDACIJSKI MEHANIZMI

Povećana količina ROS-a može se pojaviti kao posljedica smanjene funkcije zaštitnih mehanizama i/ili povećanog stvaranja ROS-a (98).

Antioksidans je bilo koja tvar koja je sposobna značajno odgoditi ili spriječiti oksidaciju supstrata. Ako dođe do smanjenja ili izostanka njihove funkcije, doći će do promocije oksidacijskog procesa.

Općenito, antioksidacijski obrambeni mehanizmi se dijele na enzimatske i neenzimatske (111). Enzimatski mehanizmi detoksifikacije ROS-a su enzimatske kaskade koje dovode do kompletne detoksifikacije reaktivnih tvari. Oni su uključeni u odstranjenje lipidnih peroksida u svrhu prekidanja autokatalitičke lančane reakcije LPO i očuvanja integriteta stanične membrane (112). Prema načinu djelovanja oni se mogu podijeliti u dvije skupine: jednu koja djeluje direktno na ROS i drugu koja djeluje kao regulator redoks procesa (111). Glavni enzimatski sustav detoksifikacije ROS-a čine enzimi SOD i katalaza. SOD katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u vodikov peroksid, a katalaza razgrađuje vodikov peroksid do vode i kisika.

Neenzimatski antioksidacijski sustavi nisu specifični kao enzimatski, međutim nisu ni toliko manje učinkoviti i važni kao prva linija antioksidacijske obrane u staničnom odgovoru na oksidacijski stres (111). Radi se o tzv. CBAs (od engl. *chain – breaking – antioxidants*), lipofilnim molekulama niske molekularne mase, koje su u stanici različito raspoređene, ovisno o svojim hidrofилnim ili hidrofobnim svojstvima. One mogu prekinuti autokatalitičku reakciju LPO i zaštititi staničnu membranu. Služe kao nespecifični ista i radikala i djeluju na principu doniranja elektrona reaktivnim kisikovim tvarima, pri čemu ROS prelazi u reducirano stanje koje nije štetno za stanicu, dok se antioksidansi se u tom procesu reduciraju. Glavni predstavnici ovog sustava su glutation (GSH), askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), koenzim Q i mokraćna kiselina (najvažniji neenzimatski antioksidansi u krvi čovjeka).

Bitna značajka GSH, jednog od najvažnijih neenzimatskih antioksidansa u organizmu, je da on ujedno predstavlja i supstrat za dva najvažnija enzimatska antioksidacijska sustava glutation peroksidazu (GPX) i glutation S transferazu (GST) (112). Ujedno se smatra i glavnim uvarom unutarstaničnog oksido-redukcijskog stanja (113). U procesu redukcije, GSH koristi svoju sulfhidrilnu skupinu cisteina, pomoću koje neutralizira ROS i sudjeluje u

popravku oštećenih molekula. GSH se u tom procesu oksidira i najčešće formira disulfidnu vezu s drugom oksidiranom molekulom GSH, pri čemu nastaje oksidirani oblik glutaciona (GSSG) (113).

Vitamin C (askorbinska kiselina) je hidrofilni antioksidans, esencijalan za život (114). Oksidirani oblik vitamina C može se ponovno reducirati pomoću glutaciona i NADPH u antioksidacijski oblik.

U vafne eukariotske neenzimatske antioksidanse ubrajaju se i sustavi glutaredoksina (GRX) i tioredoksina (TRX) (115). Ova dva funkcionalno i strukturalno slična antioksidansa sintetiziraju se u svim stanicama, a za njihovo antioksidacijsko djelovanje zaslužne su sulfhidrilne skupine dva cisteina. Tijekom redukcije ciljnih molekula ovi antioksidansi formiraju unutarmolekulske disulfidne veze između dva cisteina u aktivnom mjestu (-S-S-) (115).

Najvažniji hidrofobni neenzimatski antioksidansi u biološkim sustavima su koenzim Q i vitamin E (α-tokoferol) (116,117).

Koenzim Q ima ulogu u prijenosu elektrona u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijima. Njegova antioksidacijska uloga se temelji na njegovoj oksidaciji i redukciji prilikom prijenosa elektrona. Osim u mitohondrijima, koenzim Q je prisutan u svim biomembranama, gdje ima važnu ulogu u prekidu procesa LPO. Za regeneraciju oksidirane forme koenzima Q zaslužni su NADPH ovisna reduktaza i glutation (116).

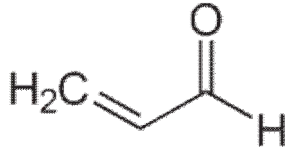
Drugi važan hidrofobni liposolubilni antioksidans je α-tokoferol (vitamin E). Zbog svoje pretežno membranske lokalizacije, djeluje prvenstveno kao obrana od LPO staničnih membrana. Oksidirani oblik vitamina E regenerira se sustavom vitamina C i koenzima Q.

U hidrofobne antioksidanse u životu ubrajaju se i estrogini i karotenoidi.

I prokariotske i eukariotske stanice odgovaraju na toksičnost ROS-a koordiniranim zaštitnim mehanizmima induciraju i ekspresiju serije gena koji kodiraju i detoksificiraju te i antioksidacijske enzime/proteine, koji omogućuju neophodnu zaštitu protiv oksidacijskog i elektrofilnog stresa. U ovom procesu ključnu ulogu imaju transkripcijski faktori NF-E2-povezani faktori (Nrf2) (118).

1.2.3 AKROLEIN (ACR)

Akrolein je nezasi eni aldehid (Slika 11), endogeni produkt i sveprisutan imbenik one i- enja okoli-a (119).



Slika 10. Strukturni prikaz akroleina

en.wikipedia.org/wiki/Acrolein

Prisutan je u hrani, pitkoj vodi, isparavanju pregrijanih ulja za kuhanje, a glavna je frakcija nezasi enog aldehida u plinovitoj fazi cigaretnog dima, kao produkt nepotpunog sagorijevanja za vrijeme poqlara, sagorijevanja plastike te emisije automobilskih ispu-nih plinova (120).

Visoka reaktivnost ini ga vrlo opasnom tvari za flivu stanicu. Me u svim i nezasi enim aldehidima, akrolein je daleko najja i elektrofil te zbog toga pokazuje i najve u reaktivnost s nukleofilima, -to dovodi do o-te enja proteina i DNK stanice. Zbog svoje velike elektrofilnosti reagira puno brfle s GSH u odnosu na HNE (109), a konjugacija s GSH je glavni put njegove eliminacije (121). Smatra se da GST A4-4 mofle katalizirati konjugaciju GSH u akrolein. Reducirana merkaptopuri na kiselina je, kao i za HNE, glavni metabolit akroleina u urinu (122).

Osim kao zavr-ni produkt lipidne peroksidacije (123), poznato je da akrolein u organizmu nastaje i kao produkt katabolizma razli itih aminokiselina i poliamina (124), ali i kao metaboli ki produkt ciklofosfamida (125).

Mutagen je i karcinogen (vrlo se u inkovito vefle za DNK uzrokuju i stvaranje adukata). Formira stabilne proteinske adukte veflu i se sa cisteinskim, histidinskim i lizinskim aminokiselinskim ostacima proteina (126). Adukti akroleina o-te uju biomakromolekule -to rezultira mutacijama, promijenjenom transkripcijom gena i modulacijom apoptoze (121).

Akrolein inducira o-te enje endotelnih stanica te dovodi do poja anog stvaranja ROS-a u ljudskim stanicama mikrovaskularnog endotela (120,127).

Mofle biti otpu-ten i no-en na razna mjesta u cirkulaciji od strane proteinskih karbonilnih adukata (128).

Identifikacija ACR kao endogenog produkta LPO sugerira istraffivanje mogu e uloge tog reaktivnog aldehida kao medijatora oksidacijskog o-te enja u brojnim bolestima ovjeka (119).

Istraffivanjem je utvr ena njegova povezanost sa malignom transformacijom benignog adenoma kolona u karcinom te –irenje akrolein proteinskih konjugata iz tumorskog tkiva u okolno tkivo (129), a dokazana je i uloga ACR kao prediktivnog biomarkera u relapsu karcinoma prostate nakon radikalnog kirur-kog zahvata (130).

1.3 OKSIDACIJSKI STRES, AKROLEIN I VASKULITIS MALIH KRVNIH ŹILA KOŹE (VMKŹ)

1.3.1 KOŹA I OKSIDACIJSKI STRES

Kofla je organ koji je podloflan razli itim vanjskim utjecajima koji dovode do stvaranja ROS-a. ROS tako er mogu nastati i endogeno u koffi (131). Do sada je istraffivana uloga ROS-a u brojnim bolestima kofle kao –to su psorijaza, vitiligo, lihen planus i atopijski dermatitis (132,133,134,135).

Rezultati studije Tanaka i sur. (136) upu uju da su ACR i HNE povezani s aktini kom elastozom u fotoo-te enoj koffi starijih osoba, karakteriziranoj akumulacijom fragmentiranih elasti nih vlakana u fotoizlofenoj koffi. U njihovom istraffivanju su imunohistokemijskim metodama detekcije protutijelima na HNE, ACR i elastin dokazani bioprodukti LPO u biopti kim uzorcima fotoizlofene kofle, sa akumulacijom u fragmentiranim elasti nim vlaknima (136).

U istraffivanju Sredoja Ti-ma i sur. (137) dokazana je uloga oksidacijskog stresa i feritina u bolesnika s rozacejom, upalnom bolesti kofle. Istraffivanje se sastojalo od imunohistokemijske analize feritina u bioptatima kofle te analize peroksida i antioksidacijskog potencijala u serumu. U bioptatima kofle bolesnika s rozacejom utvr en je zna ajno ve i broj feritin pozitivnih stanica u usporedbi s kontrolnim uzorcima zdrave kofle ($p < 0,001$). Osim toga, bolesnici s rozacejom imali su povi-ene vrijednosti koncentracije peroksida u serumu te sniflen antioksidacijski potencijal u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika ($p < 0,05$). Ve a koli ina feritina u stanicama kofle bolesnika s rozcejom obja-njava pogor-anje simptoma rozaceje nakon izlaganja UV svjetlu, jer se iz feritina osloba a slobodno fljeljezo koje je klju no u generiranju oksidacijskog stresa (137).

1.3.2 OKSIDACIJSKI STRES, AKROLEIN i VMKŽ

Oksidacijski stres i rezultirajuća LPO zahvaćaju brojna patološka stanja uključujući i upalu. Neutrofilni granulociti su najbrojnije bijele krvne stanice i imaju ključnu ulogu u urođenom imunološkom odgovoru (138). Postupak aktivacije neutrofila na mjestu upale praćen je intenzivnom produkcijom ROS-a te oslobađanjem destruktivnih hidrolitičkih enzima – to može dovesti do oštećenja stanica i tkiva (139,140). U prisutnosti adekvatnog stimulusa (primjerice upalne reakcije) neutrofili pored mnoštva citokina, otpuštaju i enzim mijeloperoksidazu (MPO), kao obrambeni mehanizam (141). Aktivirani neutrofili koriste MPO-hidrogen peroksid-klorid sistem u konverziji hidroksi-amino kiselina u akrolein (139,142).

Akutni upalni odgovor sastoji se od kaskade medijatora koji kontroliraju određene slijed događaja koji rezultira novim dejem neutrofila na mjestu upale ili ozljede. Za vrijeme akutne upale pojavljuje se mikrovaskularna ozljeda, što rezultira povećanom vaskularnom permeabilnošću i mikrovaskularnim krvarenjem. Oštećenje vaskularnih endotelnih stanica bazalne membrane i komponenti matriksa također ovisi o organskom tj. tkivnom podrijetlu endotelnih stanica. Neutrofilima posredovano oštećenje endotelnih stanica obuhvaća kompleksnu kaskadu u kojoj produkti oba stanja imaju citotoksični učinak. Također je jasno da je akutni upalni odgovor reguliran endogenom genskom ekspresijom i proinflamatornih i antiinflamatornih medijatora. Smatra se da je kontrola akutne upale povezana s aktivacijom transkripcijskog faktora NF- κ B (143,144).

U većini slučajeva kroničnog oblika VMKfi patohistološki nalaz pokazuje da se radi o neutrofilnom (leukocitoklastičnom) vaskulitisu. Sindrilaru A i sur. (145) su pokazali da, prilikom aktivacije i dijapedeze, neutrofili oštećuju unutrašnjost stijenke krvnih žila te time vjerojatno doprinose razvoju VMKfi (145). Usprkos tome, neutrofili vezani perivaskularno nisu doveli do oštećenja žila (145). *In vitro* veliki fiksirani IK uzrokuju degranulaciju i oksidativni prasak neutrofila sa otpuštanjem hidrolitičkih enzima i ROS-a u ekstracelularni prostor. Ti citotoksični učinci odvijaju se sinergistički u oštećenju endotelnih stanica u kulturi (143).

Unatoč tome što je koža kao najveći i vrlo dobro vaskulariziran ljudski organ često zahvaćena različitim oblicima sindroma vaskulitisa, postoji svega nekoliko studija o ulozi oksidacijskog stresa u patogenezi VMKfi kože. Utvrđeno je da je poremećaj imunološkog sustava, manifestiran kao vaskulitis, povezan sa značajno povišenom razinom dušikovog oksida u plazmi, kojeg luče neutrofili i endotelne stanice. Razina dušikovog oksida rasla je u bolesnika

ovisno o stupnju pro-irenosti i intenzitetu kofnih promjena (146). Istom je studijom pokazano da je o-te enje endotela u imunolo-ki uvjetovanom vaskulitisu povezano sa poreme ajem antioksidacijskog sustava. Naime, dok je aktivnost katalaze bila zna ajno povi-ena, aktivnost superoksid dismutaze je bila zna ajno sniflena u svim oblicima kofnih manifestacija vaskulitisa (146).

ROS su relativno kratkoffivu i, a mjesto njihovog djelovanja ovisi o vremenu poluffivota i difuziji pojedinog ROS. Nedavno su Keskin N i sur. (147) utvrdili da povi-ena razina oksidacijskog stresa moffe imati vafnu ulogu u sistemskom vaskulitisu (Henoch-Schönlein purpuri). Naime, pokazali su da bolesnici u aktivnoj fazi bolesti imaju zna ajno vi-u razinu oksidacijskog stresa u odnosu na bolesnike u remisiji i zdrave ispitanike (147).

Ozyazgan S. i sur (148) su u svojoj studiji dokazali ulogu upalom potaknutog oksidacijskog stresa u Behçetovoj bolesti, kroni nom vaskulitisu, karakteriziranom endotelnom disfunkcijom, povi-enom razinom ROS-a i povi-enom produkcijom i hiperfunkcijom neutrofila. U toj je studiji dokazana povi-ena razina ishemijom modificiranih albumina i poreme aj ravnoteffe prooksidansa i antioksidansa, kao rezultat upalom potaknutog oksidacijskog stresa. Time su autori (148) ujedno ukazali na njihov potencijalni zna aj u smislu novih markera oksidacijskog stresa u Behçetovoj bolesti.

S obzirom na injenice da je kofla esto zahva ena razli itim oblicima sindroma vaskulitisa, da je etiologija mnogih oblika VMKfi nepoznata te da su trenutni terapijski pristupi VMKfi relativno nespecifi ni, name e se klini ka potreba za novim istraffivanjima. Svrha novih istraffivanja je postavljanje jasnijih i specifi njih patolo-kih kriterija pojedinih oblika i faza bolesti te iskazivanje potencijalnih biomarkera prisutnosti sistemske bolesti, i/ili onih biomarkera koji upu uju na ve u mogu nost podlofnosti sistemskom obliku bolesti, sa ozbiljnom flivotnom prognozom.

Prema dostupnim literaturnim podacima do sada nisu pro avani reaktivni aldehidi u oviru etiopatogeneze VMKfi.

U prilog mogu oj povezanosti ACR i oksidacijskog stresa s VMKfi u kofli ide karakteristi an histolo-ki nalaz upalnog infiltrata, uglavnom neutrofila, koji otpu-taju snafne upalne medijatore, uklju uju i i pripadnike ROS-a. Osim toga, jak oksidacijski stres koji se pojavljuje kod upalne reakcije moffe potisnuti obrambene antioksidacijske mehanizme.

Noiri i sur. (127) su dokazali da akrolein inducira o-te enje endotelnih stanica te da dovodi do poja anog stvaranja ROS-a u stanicama mikrovaskularnog endotela.

S obzirom da je ACR za razliku od ROS-a relativno dugofivu i reaktivni aldehid te da mođe djelovati daleko od mjesta po etnog oksidativnog o-te enja, name e pitanje mogu e uloge ACR u progresiji lokaliziranog u sistemski (klini ki teffi i prognosti ki ozbiljniji) oblik bolesti. Ukoliko se utvrdi takva povezanost, otvara se put novim dijagnosti kim i intervencijskim postupcima u samom tijeku bolesti. Osim toga, bolje poznavanje to nih mehanizama koji dovode do o-te enja krvnih flila u VMKfi doprinijeti e razvoju specifi njih na ina lije enja, od trenutno relativno nespecifi nih protutupalnih i imunosupresivnih terapijskih pristupa. Ukoliko se potvrdi uloga ACR i oksidacijskog stresa u VMKfi, otvara se i put uvo enju potencijalnih antioksidansa u adjuvantnu terapiju.

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanjem se nastojalo razjasniti patofiziološko značenje akroleina, uloga oksidacijskog stresa i uinkovitost antioksidacijske obrane u bolesnika s VMKfi.

Hipoteza:

Pretpostavka je da povišena razina akroleina, povečan oksidacijski stres i poremećaj antioksidacijske obrane imaju ulogu u patogenezi i aktivnosti VMKfi na lokalnoj i sistemskoj razini.

Ciljevi:

1. Imunohistokemijskom analizom bioptata kofe bolesnika s VMKfi utvrditi prisutnost akroleina, pokazatelja oksidacijskog stresa na lokalnoj razini i usporediti ju s kontrolnim uzorcima zdrave kofe.
2. Odrediti povezanost intenziteta nakupljanja akroleina na lokalnoj razini i stupnja težine bolesti.
3. Odrediti pokazatelje oksidacijskog stresa na sistemskoj razini (engl. *Total Oxidative Capacity*, TOC) i djelotvornost ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (engl. *Total Antioxidative Capacity*, TAC) u serumu bolesnika s VMKfi te usporediti ih s kontrolnim uzorcima zdravih ispitanika.

3.ISPITANICI I METODE

3.1 ISPITANICI

Istraživanje je provedeno u Ambulanti za kožne i spolne bolesti Kabineta za dermatovenerologiju KB Dubrava Zagreb, Klinici za unutarnje bolesti KB Dubrava Zagreb, Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava Zagreb, Kliničkom zavodu za patologiju KB Dubrava Zagreb i Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković Zagreb.

Rad je obuhvatio ukupno 127 ispitanika, a sastojao od dva dijela – retrospektivnog i prospektivnog.

Retrospektivnim dijelom rada obuhvaćeno je 67 ispitanika - 37 s histološki potvrđenom dijagnozom VMKf kofle (tipa LCV) i 30 zdravih kontrola.

Prospektivnim dijelom rada je obuhvaćeno 60 ispitanika - 30 s histološki potvrđenom dijagnozom VMKf kofle (tipa LCV) i 30 zdravih kontrola. Istraživanjem je obuhvaćena analiza pokazatelja oksidacijskog stresa na lokalnoj razini (u biopsijama kofle) te analiza pokazatelja oksidacijskog stresa na sistemskoj razini (u uzorcima periferne venske krvi).

Svim ispitanicima se detaljno objasnila svrha i postupak istraživanja te se uzorkovanje vršilo tek nakon što su ispitanici dobrovoljno potpisali informirani pristanak. Sva istraživanja su se provela uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava Zagreb uz potpuno dobrovoljnu suradnju i primjereno razumijevanje sudionika. Istraživanje je bilo potpuno usklađeno s etičkim standardom Deklaracije iz Helsinkija iz 1975. godine te njezinim modifikacijama iz 1983.

3.1.1 Ispitanici u retrospektivnom dijelu rada

U okviru retrospektivnog dijela rada provedeno je imunohistokemijsko određivanje ACR na 37 arhiviranih uzoraka kofle bolesnika histološki potvrđenog VMKf kofle (tipa LCV) u različitim fazama bolesti, ulofenih u parafinske blokove u Kliničkom zavodu za patologiju KB Dubrava Zagreb.

Kontrolnu skupinu činilo je 30 biopsija zdrave, klinički nepromijenjene kofle, iz arhive parafinskih blokova Kliničkog zavoda za patologiju KB Dubrava Zagreb. Radi se o

bolesnicima kojima je u tijeku određenih indiciranih dijagnostičkih postupaka u kojima je pretraga direktne imunofluorescencije kofe (DIF pretraga), koji je konačni rezultat bio negativan. Ispitanici iz kontrolne zdrave skupine bili su po dobi i spolu prisposobivi skupini bolesnika s VMKf kofe.

3.1.2 Ispitanici u prospektivnom dijelu rada

U nastavku rada prospektivno je proučeno 30 bolesnika različitog spola i dobi sa različitim fazama aktivnosti VMKf u kofu.

U tim je bolesnicima u okviru jasne i utemeljene dermatološke indikacije u kojima je biopsija kofe, u sklopu rutinskog dijagnostičkog postupka patohistološke potvrde dijagnoze.

Uz anamnezu, klinički status i rutinske dijagnostičke parametre procjene aktivnosti i progresivnosti bolesti, prospektivnim bolesnicima je na biopsijama kofe, imunohistokemijski određivani ACR, završni produkt lipidne peroksidacije i pokazatelj oksidacijskog stresa na lokalnoj razini.

Osim toga, u svrhu procjene sistemskog oksidacijskog stresa, u istih je bolesnicima pristupljeno analizi TOC i TAC u serumima. Vrijednosti parametara upale i indiciranih imunoloških parametara određivani su standardnim laboratorijskim metodama u okviru rutinske dijagnostičke obrade bolesnika s VMKf kofe, kojom se procjenjuje aktivnost bolesti i postojanje znakova sistemske bolesti. Na taj se način bolesnici nisu izlagali stresu dodatnih venepunkcija za analizu TOC i TAC.

Kontrolnu skupinu za analizu ACR u prospektivnom dijelu rada činilo je 30 biopsata zdrave, klinički nepromijenjene kofe, dobivene na isti način kao u prethodno opisanom retrospektivnom dijelu rada.

Kontrolnu skupinu za analizu TOC i TAC činilo je 30 seruma zdravih muškaraca i žena koji su išli na planirane rutinske sistematske preglede. Kriteriji isključenja iz studije bili su: teške kronične i upalne bolesti, manifestni vaskulitis u kofu, trenutno prisutna terapija lijekovima, zlouporaba droge i alkohola. Prije samog uzimanja krvi ispitanici su bili podvrgnuti ispitivanju o njihovoj detaljnoj anamnezi te navikama. Njihovi krvni uzorci bili su kontrola za određivanje biomarkera oksidacijskog stresa, medijatora upale i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta.

Navedeni su uzorci krvi prikupljeni u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KB Dubrava Zagreb. Ispitanici iz kontrolne skupine bili su po dobi i spolu prisposobivi prospektivnoj skupini bolesnika s VMKfi.

3.2 METODE

3.2.1 ANAMNEZA

U retrospektivnom dijelu rada korišteni su anamnestički podaci o spolu i dobi ispitanika te o patohistološkom stupnju aktivnosti bolesti (fazi bolesti) iz arhivirane medicinske dokumentacije. Nakon pregleda svih mikroskopskih preparata, bolesnici su sukladno stupnju aktivnosti bolesti raspodijeljeni u tri skupine (1. floridna faza bolesti - F; 2. aktivna faza bolesti - A; 3. faza regresije - R)

Relevantni anamnestički i klinički podaci u prospektivnih bolesnika s VMKfi kole prikupljeni su tijekom specijalističkih dermatoloških ambulantnih i konzilijarnih pregleda.

U istraživanju su bili uključeni slijedeći parametri iz anamneze: spol, dob, podaci o trajanju bolesti, simptomima bolesti, uzimanju lijekova (nesteroidni protuupalni lijekovi, antibiotici, sulfonamidi, tiouracil, inhibitori angiotenzin konvertaze, derivati fenitoina), funkcijama, navikama, o eventualno pridruženim kroničnim bolestima i zloćudnim bolestima. Osim navedenih parametara, bolesnicima s VMKfi kole upućena su anamnestička pitanja o postojanju manifestacija sistemske bolesti: temperatura, bolovi u zglobovima, otok zglobova, bolovi u mišićima, bolovi u trbuhu, proljev, primjese svježe krvi u stolici, kašalj, primjese krvi u iskašljaju, glavobolja, parestezije, prisutnost krvi u mokraći.

3.2.2 DIJAGNOSTIČKA OBRADA

U sklopu prospektivnog dijela rada proučeno je obuhvaćeno 30 bolesnika s VMKfi, kojima je u inženjerski indicirana standardna dijagnostička obrada VMKfi, uz multidisciplinarni klinički pristup svakom pojedinom bolesniku, ovisno o prisutnoj simptomatologiji i suspektnom kliničkom nalazu zahvaćenosti pojedinih organa (standardna dijagnostička obrada opisana je u poglavlju 1.1.6 Dijagnoza i liječenje VMKfi, str.14)

U svih 30 prospektivnih bolesnika s VMKfi i svih 30 ispitanika iz kontrolne skupine statističkom analizom bili su obuhvaćeni slijedeći upalni, imunološki i biokemijski parametri, dobiveni u sklopu u inženjerske dijagnostičke obrade:

CRP, eritrociti (Er), hemoglobin (Hgb), hematokrit (Htc), prosje ni volumen eritrocita (engl. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), prosje ni hemoglobin u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH), prosje na koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), širina distribucije volumena eritrocita (engl. *Red Cell Distribution Width*, RDW), željezo (Fe), nezasi eni kapacitet vezivanja željeza (engl. *Unsaturated Iron Binding Capacity*, UIBC), ukupni kapacitet vezivanja željeza (engl. *Total Iron Binding Capacity*, TIBC), feritin, trombociti (Trc), prosje ni volumen trombocita (engl. *Mean Platelet Volume*, MPV), leukociti (Leu), neutrofili limfociti, monociti, eozinofili, bazofili, glukoza u krvi (GUK), trigliceridi (TRIG), kolesterol, HDL kolesterol (engl. *High-Density Lipoprotein Cholesterol*, HDL), LDL kolesterol (engl. *Low-Density Lipoprotein Cholesterol*, LDL), urea, kreatinin, urat, kalij (K), natrij (Na), kloridi (Cl), kalcij (Ca), fosfati, ukupni bilirubin, aspartat-aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), gama glutamil transferaza (GGT), alkalna fosfataza (ALP), laktat dehidrogenaza (LDH), kreatin kinaza (CK), ukupni proteini, albumini.

Kontrolnu skupinu za analizu prethodno navedenih parametara inile su vrijednosti upalnih, imunoloških i biokemijskih parametara 30 zdravih muškaraca i žena, dobivenih laboratorijskom analizom njihovih uzoraka krvi u sklopu planiranih sistematskih pregleda. Na taj se na in ispitanici iz kontrolne skupine nisu izlagali stresu dodatnih venepunkcija za potrebe ovog istraffivanja.

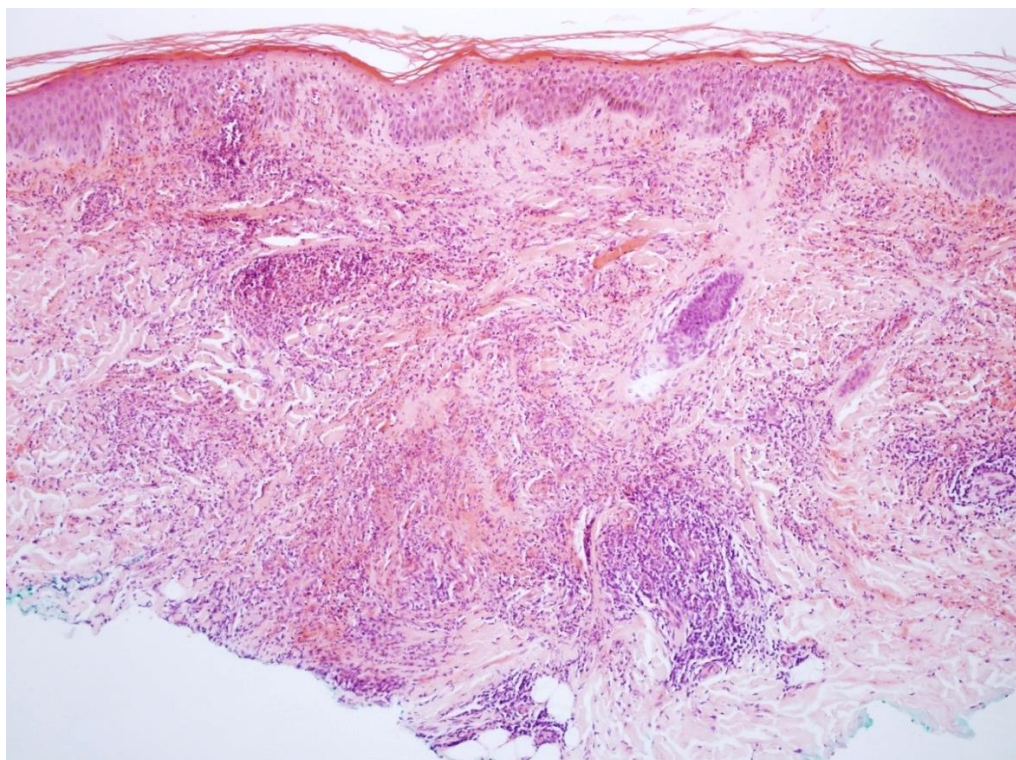
3.2.3 BIOPSIJA KOŽE

U sklopu rutinskog dijagnostičkog postupka patohistološke potvrde dijagnoze, a nakon utemeljene specijalističke indikacije, uinjena je biopsiju kože, koja se smatra se zlatnim standardom dijagnoze VMKfi kože. Uzorci kože (3-5mm) uzeti su eliptičnom probatornom incizijskom biopsijom pomoću skalpela u lokalnoj infiltracijskoj anesteziji (2 % lidokainom) sa mjesta najizraffijenije svjeffle vaskulitne promjene na koži, koja prethodno nije tretirana lokalnom niti sistemskom terapijom. Posebna je pozornost posve ena optimalnom vremenu uzimanja biopsije kože tj. biopsija kože je uinjena unutar 48 sati od pojave vaskulitne lezije na koži. Kirurški je postupak izveden po svim pravilima asepse i sterilnosti kako bi se izbjegla mogućnost infekcije.

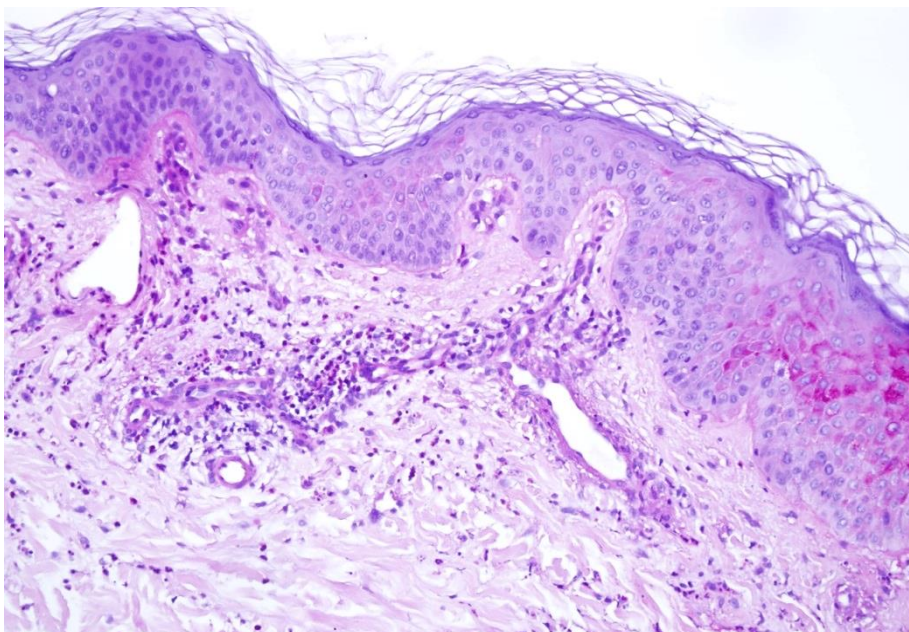
3.2.4 PATOHISTOLOŠKA ANALIZA BIOPTATA KOŽE

Dobiveno tkivo fiksirano je u 10% puferiranom formalinu i upućeno na patohistološku analizu. Nakon rutinskog procesuiranja i uklapanja u parafin, izrezani su preparati debljine 4µm i rutinski obojani hemalaun-eozinom i PAS (Perjodna kiselina-Schiff reagens) metodom. Nakon pregleda svih mikroskopskih preparata i postavljanja patohistološke dijagnoze, bolesnici su sukladno stupnju aktivnosti bolesti raspodijeljeni u tri skupine:

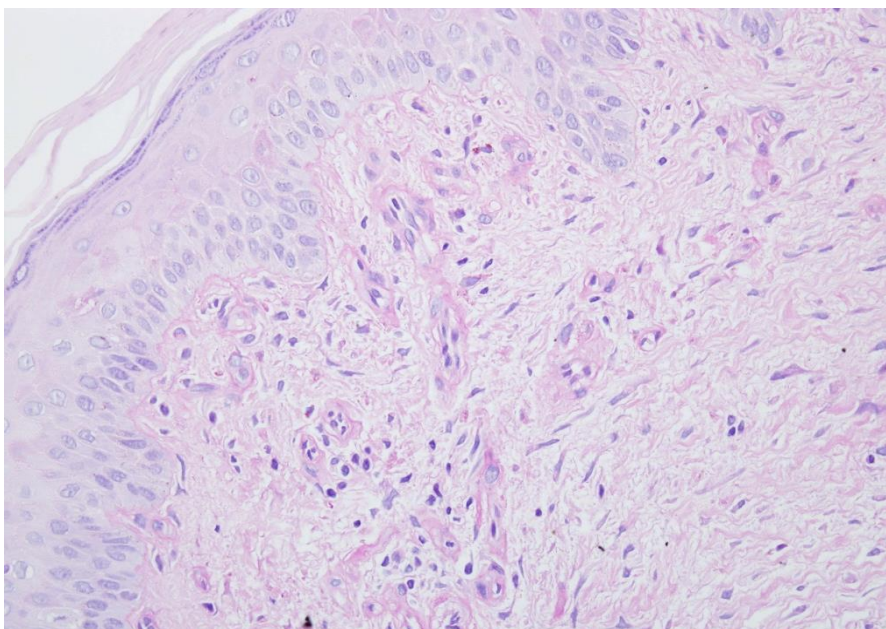
1. floridna faza ó F (teški oblici s opsefnom fibrinoidnom nekrozom, ulceracijom, infiltratom oko i/ili nekrozom flijezda) (Slika 11)
2. aktivna faza bolesti ó A (upalni infiltrat s leukocitoklazijom, fokalna fibrinoidna nekroza stijenki krvnih žila) (Slika 12)
3. faza regresije ó R (oskudan infiltrat, rijetka fokalna leukocitoklazije, bez fibrinoidne nekroze) (Slika 13)



Slika 11. Floridna faza KLCV, HE 100x ó spongioza epidermisa, egzocitoza upalnih stanica, opsefna fibrinoidna nekroza krvnih žila površinskog i dubokog spleta, a upalni infiltrat zahvaća i razara kofna adneksa



Slika 12. Aktivna faza KLCV, PAS 200x ó dominantno zahva anje krvnih ffla povr-ínskog spleta upalnom infiltracijom, mije-ani upalni infiltrat u kojem dominiraju granulociti, edem dermisa, ekstravazati eritrocita i podru ja leukocitoklazije



Slika 13. Faza regresije KLCV, PAS 400x ó oskudni perivaskularni, uglavnom mononuklearni upalni infiltrati i umnofleni fibroblasti

3.2.5 IMUNOHISTOKEMIJSKO ODREĐIVANJE AKROLEINA U BIOPTATIMA KOŽE – PROCJENA OKSIDACIJSKOG STRESA NA LOKALNOJ RAZINI

Iz preostalog parafinskog materijala u injeni su dodatni 4 μ m rezovi na silaniziranim stakalcima i obrađeni za imunohistokemijsku analizu.

Imunohistokemijskoj analizi ACR, završnog produkta lipidne peroksidacije i pokazatelja oksidacijskog stresa na lokalnoj razini, bili su podvrgnuti bioptati kofe ukupno 97 ispitanika ó 67 bioptata kofe ispitanika s dijagnozom VMKfi kofe te 30 bioptata zdrave kofe ispitanika iz kontrolne skupine. Imunohistokemijska analiza prisustva reaktivnog aldehida ACR u biopti kom materijalu bolesnika s VKMfi kofe i kontrolnim uzorcima zdrave nepromijenjene kofe provedena je pomoću izvornih mišjih monoklonalnih protutijela na akrolein-lizinski konjugat (pripremljenih u Laboratory of Food and Biodynamics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan, ljubazno – u dr. K.Uchide) u razrjećenju 1:10 te upotrebom En Vision metode (149).

Parafinski rezovi tkiva bili su podvrgnuti procesu deparafiniranja ksilenom i rehidracije u opadajućem nizu koncentracija etanola, a potom su isti preparati bili uronjeni 3 minute u metanol. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu (PBS -u) 3 puta po 5 minuta, preparati su inkubirani dva sata u prisutnosti primarnih protutijela na akrolein ó lizinske konjugate (razrjećenje 1:10). Potom su isprani u PBS-u 3 puta po 5 minuta, nakon čega su im blokirane endogene peroksidaze u otopini 3% vodikovog peroksida 20 minuta. Po isteku inkubacije preparati su isprani u Tris fosfatnom puferu (TBS-u) te inkubirani 30 minuta Envision reagensom. Nakon ponovnog ispiranja s TBS-om 3 puta po 5 minuta, akrolein-lizinski konjugati su vizualizirani dodatkom otopine 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorida (DAB, Dako), koji je kod vezanog protutijela tj. prisutnog antigena davao smeđe obojenje. Suvišak DAB-a isprao se destiliranom vodom, uz kontrastno bojanje otopinom hemalauna. Nakon ponovnog ispiranja vodovodnom vodom, pomoću medija za prekrivanje (Kanada balzam) i pokrovnih stakalaca, napravljeni su trajni preparati.

Prisutnost akroleina u biopti kom materijalu (endotel, stijenka krvnih žila i okolni dermis) određivana je semikvantitativno pomoću Olympus BX41 mikroskopa, kamere Olympus DP71 i originalnog programa za obradu fotografija Cell[®] Soft Imaging System (Imaging Software for Life Science Microscopy).

Pod velikim povećanjem mikroskopa (400x) semikvantitativno je očit intenzitet imunohistokemijske reakcije u području najjačeg intenziteta, a nakon prethodne orijentacije na malom povećanju mikroskopa (10x).

Intenzitet imunohistokemijske reakcije ekspresije akroleina (ACR) u MKfi kofe i okolnom području izražen je bodovima prema tablici 4.

Tablica 4. Intenzitet imunohistokemijske reakcije ekspresije ACR izražen bodovima

Intenzitet imunohistokemijske reakcije	Bodovi
Negativna reakcija	0
Slabo fari-na pozitivna reakcija	1
Umjereno pozitivna reakcija	2
Izrazito difuzno pozitivna reakcija	3

3.2.6 VENEPUNKCIJA, PRIKUPLJANJE I POHRANJIVANJE UZORAKA KRVI

Uzorci periferne venske krvi za određivanje TOC i TAC su nakon vađenja venepunkcijom centrifugirani 10 minuta na 3500 okretaja u minuti.

Posebna je pozornost posvećena svježoj pohrani prikupljenih seruma. Za analizu su korišteni samo optimisti uzorci. Nisu korišteni uzorci koji su stajali duže od 30 minuta na sobnoj temperaturi, hemolizirani serumi, lipemni serumi, heparin plazma i puna krv. Uzorci seruma za analizu pohranjeni su do trenutka upotrebe na temperaturi od - 85 °C.

3.2.7 ODREĐIVANJE UKUPNOG OKSIDACIJSKOG KAPACITETA (TOC) I UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA (TAC) – PROCJENA OKSIDACIJSKOG STRESA NA SISTEMSKOJ RAZINI

U svrhu procjene sistemskog oksidacijskog stresa u bolesnika s VMKfi pristupilo se analizi TOC i TAC u serumima ispitanika. Navedenoj analizi podvrgnuto je 60 ispitanika, od kojih 30 ispitanika s VMKfi kofe i 30 zdravih ispitanika.

Određivanje ukupnog oksidacijskog kapaciteta (TOC) i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) izvršeno je dostupnim enzimatskim testom za mjerenje peroksida u biološkim tekućinama (Omnignostix GmbH & Co KG, ljubazno – u dr. F. Tatzbera).

Radi se o kolorimetrijskim/fotometrijskim brzim testovima za kvantitativno određivanje peroksida u serumu (TOC) i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) u serumu. Obje metode temelje se na enzimatskoj reakciji između enzima i kromogenog supstrata tetrametilbenzidina, nakon čega se razvija boja, čiji se intenzitet mjeri fotometrijski na valnoj duljini od 450 nm.

3.2.7.1 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PEROKSIDA U SERUMU - TOC

Načelo metode:

Određivanje peroksida temelji se na enzimatskoj reakciji između peroksidaze i peroksida te promjeni boje kromogenog supstrata tetrametilbenzidina (TMB). Nakon dodatka otopine za zaustavljanje reakcije, tzv. stop otopine (2 M H₂SO₄), plava boja se proporcionalno mijenja u plavu. Intenzitet boje se mjerio fotometrijski na valnoj duljini od 450 nm. Kvantifikacija endogenog peroksida napravljena je u odnosu na standardnu krivulju koja podrazumijeva serijska razrjeđenja H₂O₂ (peroksida).

Sadržaj kita za izvođenje TOC metode:

DM P-0013 protokolarni pufer (citratni pufer)

DM P-0036 peroksidaza

DM P-0055 supstrat (otopina TMB)

DM P-0080 otopina za zaustavljanje (tzv. stop otopina koja sadrži 2 M H₂SO₄)

BA D-0032 mikrotitarska ploča sa 96 bunarića

DM P-4201 standard A 0 mM H₂O₂

DM P- 4202 standard B 0.125 mM H₂O₂

DM P-4203 standard C 0.25 mM H₂O₂

DM P-4204 standard D 0.5 mM H₂O₂

DM P-4205 standard E 1 mM H₂O₂

DM P-4251 kontrola 1

DM P-4252 kontrola 2

Ostali materijali i oprema koji su korišćeni u istraživanju, a nisu raspoloživi u komercijalnom kitu: različite kalibrirane precizne mikropipete (npr. 10-100 µl/ 100/1.000µl), ELISA i ta mikrotitarskih ploča na 450 nm, Vortex mixer, destilirana voda.

Prije izvođenja postupka za određivanje aktivnosti peroksida pripremljena je mješavina reagensa slijede ih sastojaka: 20 ml pufera, 200 µl supstrata (otopina TMB) i 20 µl peroksidaze. Navedeni reagensi izmiješani su neposredno prije upotrebe (navedena mješavina reagensa stabilna je 15 minuta), a do postupka miješanja svi su bili pohranjeni na temperaturi +4°C.

Standard je bio pripremljen u razrje enjima prema tablici 5:

Tablica 5. Razrje enja peroksida za odre ivanje aktivnosti peroksida u serumu

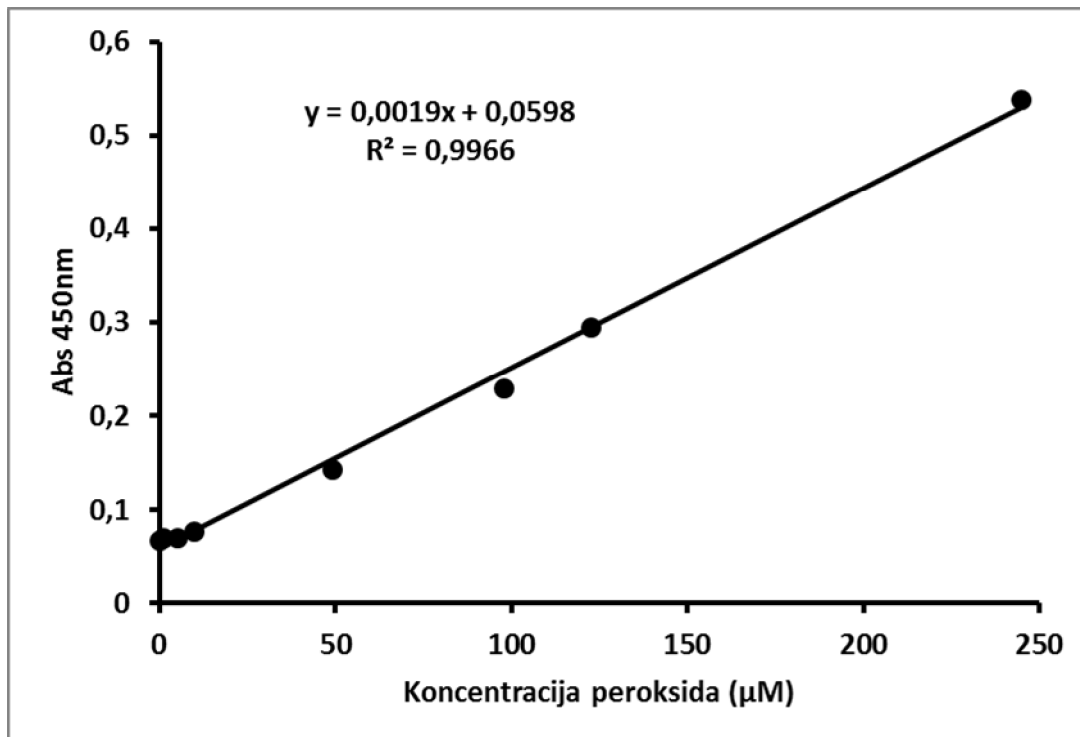
standard	Razrje enja peroksida	Koncentracija peroksida (μM)	Peroksid/ μl	H ₂ O/ μl
10	1:1000	9791	50(30%-tnog)	49950
9	1:10000	979,1	200STD10	1800
8	1:20000	489,55	1000STD9	1000
7	1:40000	244,77	1000STD8	1000
6	1:80000	122,385	1000STD7	1000
5	1:100000	9,791	200STD9	1800
4	1:200000	48,955	1000STD5	1000
3	1:1000000	9,791	400STD4	1600
2	1:2000000	4,8955	1000STD3	1000
1	1:10000000	0,9791	200STD3	1800
0				900

Postupak za odre ivanje TOC-a:

1. U mikrotitarsku plo icu s 96 bunari a najprije se pipetira 10 μl standarda, kontrole i uzorka bolesnika (seruma). Svaki serum se stavlja u triplikatu.
2. Potom se na standarde i uzorke doda 200 μl mje-avine reagensa po bunari u.
3. Nakon inkubacije pri sobnoj temperaturi od 5 minuta izmjeri se adsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm.
4. Slijedi inkubacija od 20 minuta na temperaturi 4 °C.
5. Potom se pipetira 50 μl otopine za zaustavljanje tzv. stop otopine 2 M H₂SO₄ (4 ml konc. H₂SO₄ + 32 ml H₂O) u svaki bunari mikrotitarske plo ice.
6. Nakon 3 min plo icu je potrebno lagano protresti te o itati absorbanciju otopine u bunari ima na ita u mikrotitarskih plo ica na valnoj duljini 450 nm.

7. Rezultat mjerenja je izražen kao razlika između 2. i 1. mjerenja, koji je proporcionalna sadržaju peroksida u uzorku.

Koncentracija peroksida određena je prema formuli na temelju baždarnih krivulje (Slika 14).



Slika 14. Baždarna krivulja za određivanje koncentracije peroksida

3.2.7.2 ODREĐIVANJE UKUPNOG ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA – TAC

Načelo metode:

Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta temelji se na enzimatskoj reakciji između peroksidaze i peroksida te promjeni boje kromogenog supstrata tetrametilbenzidina (TMB). Nakon dodatka otopine za zaustavljanje reakcije tzv. stop otopine (2M H₂SO₄) plava boja se proporcionalno mijenja u plavu. Intenzitet boje se mjeri fotometrijski na valnoj duljini od 450 nm. Kvantifikacija ukupnih antioksidansa iz plazme napravljena je u odnosu na standardnu krivulju koja podrazumijeva različite razriježenja mokra ne kiseline kao najučestalijeg antioksidansa u krvi. Alternativno se koriste razriježenja vitamina C kao standard.

Sadržaj kita za izvođenje TAC metode:

DM P-0013 protokolarni pufer

DM P-0035 peroksid (30% H₂O₂)

DM P-0036 peroksidaza

DM P-0055 supstrat (otopina TMB)

DM P-0080 otopina za zaustavljanje tzv. stop otopina koja sadrži 2 M H₂SO₄

BA D-0032 mikrotitarska ploča sa 96 bunarića

DM P-4101 standard A 0 mM

DM P-4102 standard B 0,375 mM

DM P-4103 standard C 0.75 mM

DM P-4104 standard D 1.5 mM

DM P-4105 standard E 3 mM

DM P-4151 kontrola 1

DM P-4152 kontrola 2

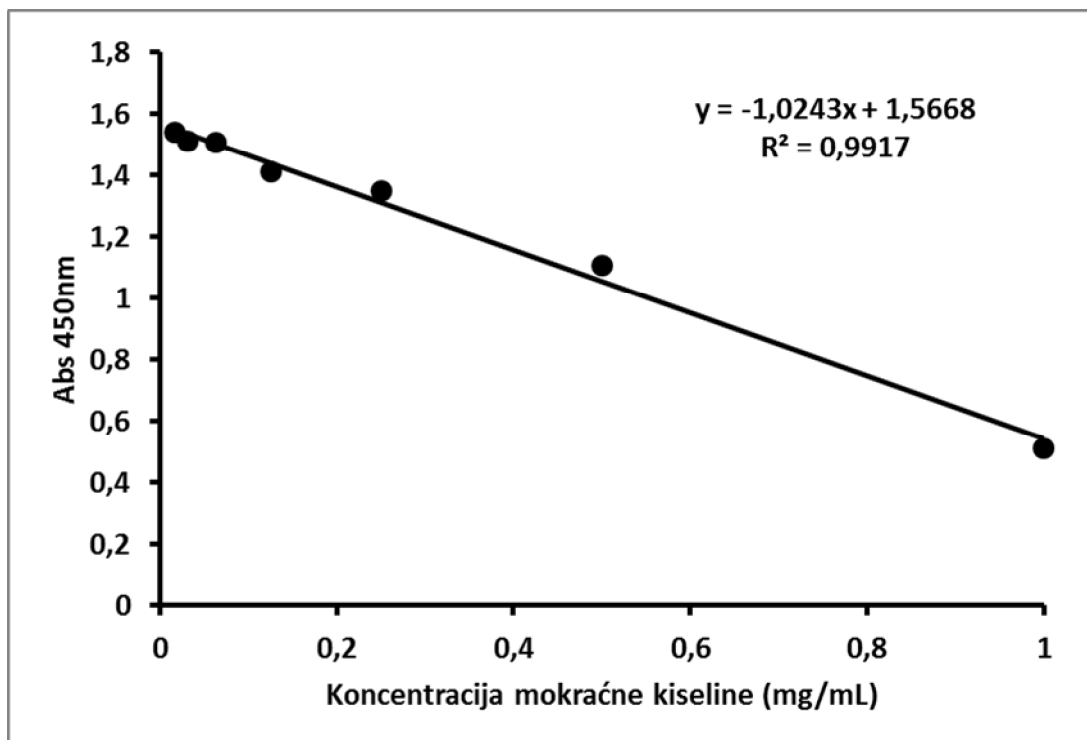
Ostali materijali i oprema koja je korištena u istraživanju, a nije raspoloživa u komercijalnom kitu: različite kalibrirane precizne mikropipete (npr. 10-100 µl/ 100/1.000µl), ELISA ploča na kojem je moguće očitati adsorbanciju na 450 nm, Vortex mixer, destilirana voda.

Postupak za određivanje TAC-a:

Priprema mješavine reagensa A: Pomiješati 10 mL pufera i 10 µl peroksida. Navedena mješavina je stabilna 15 minuta.

Priprema mješavine reagensa B: Pomiješati 5mL pufera, 50 µl supstrata (otopina TMB) i 5µl peroksidaze

1. Pipetirati 25ml standarda, kontrola i uzorka (seruma) u bunari na mikrotitarskoj ploici.
2. Pipetirati 100 ml mješavine reagensa A po bunari u.
3. Nakon inkubacije od 5 minuta potrebno je dodati 50 ml reagensa B i izmjeriti adsorbanciju na valnoj duljini od 450 nm.
4. Uzorci se inkubiraju 15 minuta na temperaturi 4 °C prije nego što se doda 50 ml otopine za zaustavljanje, tzv. stop otopine - 2 M H₂SO₄ (4 ml konc. H₂SO₄ + 32 ml H₂O) po bunari u mikrotitarske ploice.
5. Potom se očitava absorbancija otopine u bunari i očitava u mikrotitarskih ploica na valnoj duljini 450 nm.
6. Rezultat mjerenja je izražen kao razlika između 2. i 1. mjerenja. Ukupni antioksidacijski kapacitet u uzorku je proporcionalan ukupnom antioksidacijskom kapacitetu mokra ne kiseline, koji je izražen prema formuli na temelju baždarne krivulje (Slika 15).



Slika 15. Bafidarna krivulja za odre ivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta mokra ne kiseline

3.2.8 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statisti ku obradu dobivenih rezultata primijenjene su standardne statisti ke metode deskriptivne statistike za prikaz vrijednosnih varijabli: aritmeti ka sredina, standardna devijacija i raspon, prosjek za prikaz zbirnih vrijednosti atributivnih varijabli, ² test i Studentov T test. Nadalje, svi biokemijski parametri bili su podvrgnuti analizi me usobne povezanosti koriste i Pearsonov koeficijent korelacije koji se koristi u slu ajevima kada izme u varijabli promatranog modela postoji linearna povezanost i neprekidna normalna distribucija. Prilikom izra unavanja korelacije vrijednosti usamljenih *outliera* bile su isklju ene prilikom izra unavanja korelacije.

Pri statisti koj analizi kori–teni su ra unalni programi Statistica 7.0 (StatSoft Inc., SAD) i SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific Corporation, SAD).

Za sve testove uzeta je razina zna ajnosti $p < 0.05$.

Rezultati su prikazani u fotografijama, tablicama i grafikonima.

4. REZULTATI

4.1 Opći podaci o ispitanicima kojima je učinjena imunohistokemijska analiza akroleina u biopstatima kože

Podaci o ispitanicima kojima je učinjena imunohistokemijska analiza akroleina u biopstatima kože prikazani su u tablici 6. Istraživanje je obuhvatilo 67 bolesnika s vaskulitisom i 30 zdravih ispitanika (ukupno 97 ispitanika). U skupini bolesnih ispitanika bilo je 33 muškarca i 34 žene, a u skupini zdravih ispitanika 12 muškaraca i 18 žena. Prosječna dob ispitanika bila je $56,43 \pm 16,4$, u rasponu od 19 do 88 godina.

Bolesnici s VMKf kože su na temelju patohistološkog nalaza biopsije vaskulitisa promjene na koži bili razvrstani u tri skupine: 1. bolesnici u floridnoj fazi bolesti (F); 2. bolesnici u aktivnoj fazi bolesti (A); 3. bolesnici u regresivnoj fazi bolesti (R). Od 67 bolesnika s vaskulitisom, u 1. skupini (floridnoj fazi bolesti - F) bilo je 11 bolesnika (16,42%), u 2. skupini (aktivnoj fazi bolesti - A) bilo je 45 bolesnika (67,16%), a u 3. skupini (regresivnoj fazi bolesti - R) bilo je 11 bolesnika (16,42%).

Tablica 6. Prikaz op ih podataka o retrospektivnim i prospektivnim ispitanicima kojima je u injena imunohistokemijska analiza akroleina u bioptatima kofe (n = broj ispitanika, a u zagradi je izraflen postotak)

KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	n	(%)
Broj ispitanika	97	
Zdravi	30	
Bolesnici s VMKfi	67	(69,07%)
Spol ispitanika		
Muški	45	
Zdravi	12	
Bolesnici s VMKfi	33	(77,78%)
Ženski	52	
Zdravi	18	
Bolesnice s VMKfi	34	(65,39%)
Dob ispitanika (godine)		
Prosjeak	56,43	
Raspon	19-88	
Bolesnici s VMKŽ razvrstani prema fazi bolesti	67	
1. floridna faza (F)	11	(16,42%)
2. aktivna faza (A)	45	(67,16%)
3. faza regresije (R)	11	(16,42%)

Raspodjela bolesnika s VMKfi kofe prema fazi bolesti i spolu predo ena je u tablici 7.

U 1. skupini ispitanika, od ukupno 11 bolesnika s floridnom fazom vaskulitisa (F), bilo je 6 fena (54,55%) i 5 mu-karaca (45,45%). U 2.skupini ispitanika, u aktivnoj fazi bolesti (A), bile su 23 fene (51,11%), i 22 mu-karca (48,89%). U 3. skupini bolesnika, u fazi regresije vaskulitisa (R), bilo je 5 fena (45,45%) i 6 mu-karaca (54,55%).

U analiziranom randomiziranom uzorku bolesnika s VMKfi kofe utvr ena je ve a u ustalost osoba flenskog spola u skupinama bolesnika s floridnom i aktivnom fazom vaskulitisa, a osoba mu-kog spola u skupini bolesnika s vaskulitisom u regresiji. U analiziranom randomiziranom uzorku nije utvr ena je statisti ki zna ajna razlika u broju bolesnika s VMKfi prema spolu i fazi bolesti ($\chi^2 = 0,189$, df =3; p=0,9793; p>0,05).

Tablica 7. Prikaz raspodjele bolesnika s VMKfi prema fazi bolesti i spolu

Bolesnici s VMKŽ	Spol		Ukupno
	Ženski	Muški	
1. floridna faza (F)	6	5	11
2. aktivna faza (A)	23	22	45
3. faza regresije (R)	5	6	11
Ukupno	34	33	67

4.2 Karakteristike bolesnika u floridnoj fazi vaskulitisa (F)

Bolesnici su uvršteni u ovu skupinu na temelju dostupnih kliničkih podataka te patohistološkog nalaza vaskulitisa u floridnoj fazi (F) u biopsatima kofe. Skupina bolesnika s floridnom fazom vaskulitisa (n=11) predstavlja 16,42% od ukupnog broja bolesnika s VMKfi kofe (n=67). Od ukupno 11 bolesnika s floridnom fazom vaskulitisa, 6 su bile žene (54,55%), a 5 muškarci (45,45%), s prosječnom životnom dobi 56 godina \pm 16,73, u rasponu od 23 do 88 godina. Najveći broj bolesnika bio je u dobnom razredu od 51 do 60 godina, njih 4 (36,36%), a niti jedan ispitanik nije pripadao dobnim razredima od 11 do 20 godina, niti dobnom razredu od 71 do 80 godina (Tablica 8).

Tablica 8. Prikaz ispitanika u floridnoj fazi vaskulitisa (F) prema spolu i dobnim razredima

Godine starosti	Spol		Ukupno
	Ženski	Muški	
11-20	0	0	0
21-30	1	0	1
31-40	1	0	1
41-50	1	0	1
51-60	2	2	4
61-70	1	2	3
71-80	0	0	0
81-90	0	1	1
Ukupno	6	5	11

4.3 Karakteristike bolesnika u aktivnoj fazi vaskulitisa (A)

Bolesnici su uvršteni u ovu skupinu na temelju dostupnih kliničkih podataka i patohistoloških nalaza vaskulitisa u aktivnoj fazi (A) u biopsijama kofe. Skupina bolesnika s aktivnom fazom vaskulitisa (n=45) predstavlja 67,16% od ukupnog broja bolesnika s VMKf kofe (n=67). U toj skupini bolesnika bile su 23 bolesnice (51,11%) i 22 bolesnika (48,89%), s prosječnom životnom dobi 57,71 godina \pm 15,29 u rasponu od 19 do 79 godina. Najveći broj bolesnika bio je u dobnoj razredi od 51 do 60 godina, njih 15 (33,33%), a niti jedan bolesnik u dobnoj razredi od 81 do 90 godina (Tablica 9).

Tablica 9. Prikaz ispitanika s aktivnom fazom vaskulitisa (A) prema spolu i dobnoj razredima

Godine starosti	Spol		Ukupno
	Ženski	Muški	
11-20	2	0	2
21-30	0	2	2
31-40	2	0	2
41-50	2	3	5
51-60	10	5	15
61-70	4	2	6
71-80	4	9	13
81-90	0	0	0
Ukupno	24	21	45

4.4 Karakteristike bolesnika u fazi regresije vaskulitisa (R)

Bolesnici su uvršteni u ovu skupinu na temelju dostupnih kliničkih podataka i patohistoloških nalaza vaskulitisa u regresiji (R) u biopsijama kofe. Skupina bolesnika s vaskulitisom u regresiji (n=11) predstavlja 16,42% od ukupnog broja bolesnika s VMKf kofe. U skupini s vaskulitisom u regresiji bilo je 5 bolesnica (45,45%) i 6 bolesnika (54,55%), s prosječnom životnom dobi 51,64 godina \pm 19,23, u rasponu od 23 do 76 godina. Najveći broj bolesnika

bio je u dobnim razredima od 21 do 30 godina, od 61 do 70 godina, od 71 do 80 godina, po 3 bolesnika u svakom navedenom dobnom razredu (27,27%). Niti jedan bolesnik iz navedene skupine ispitanika nije pripadao dobnim razredima od 11 do 20 godina, od 51 do 60 i od 81 do 90 godina (Tablica 10).

Tablica 10. Prikaz ispitanika s vaskulitisom u fazi regresije (R) prema spolu i dobnim razredima

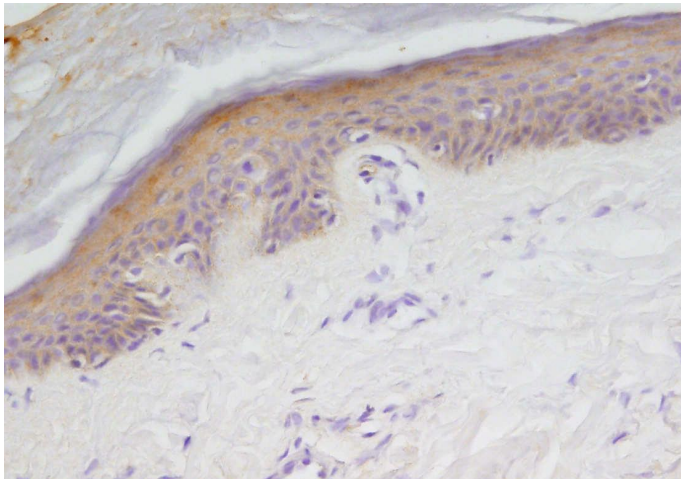
Godine starosti	Spol		Ukupno
	Ženski	Muški	
11-20	0	0	0
21-30	1	2	3
31-40	1	0	1
41-50	0	1	1
51-60	0	0	0
61-70	0	3	3
71-80	3	0	3
81-90	0	0	0
Ukupno	5	6	11

4.5 Kontrolna skupina ispitanika

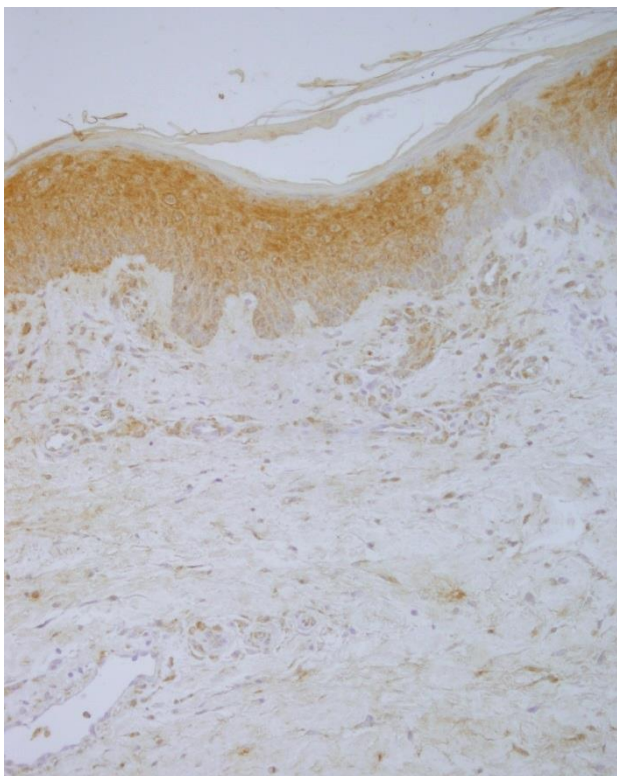
Kontrolna skupina bolesnika (n=30) predstavlja 30,927% od ukupnog broja ispitanika (n=97) koji su po spolu i dobi bili prisposodivni bolesnicima s vaskulitisom. U kontrolnoj skupini bilo je 18 žena (60%) i 12 muškarca (40%), s prosječnom životnom dobi 52,07 godina \pm 16,85, u rasponu od 20 do 82 godine. Niti jedan od ispitanika u kontrolnoj skupini nije imao vaskulitis, niti bilo koju drugu bolest kofle.

4.6 Ekspresija akroleina u bioptatima kože zdravih ispitanika i bolesnika s vaskulitisom

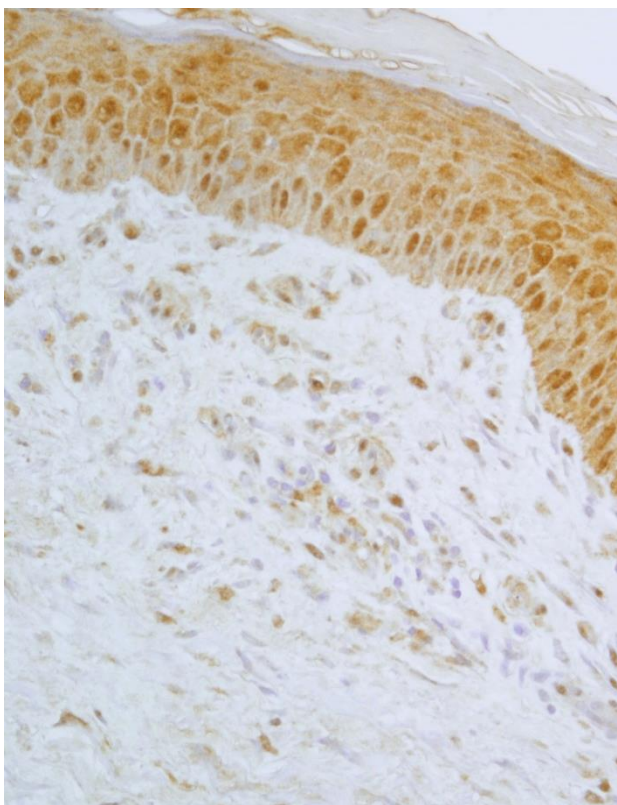
Ekspresija akroleina određivala se u bioptatima kože svih ispitanika s VMKf kože (KLCV). Analizirana je prisutnost akroleina u endotelu i stijenjkama malih krvnih žila te okolnoj koži. Pozitivne stanice obojene su imunohistokemijskom reakcijom smeđe. U kontrolnim uzorcima klinički zdrave kože reakcija na akrolein je bila negativna, označena s 0 bodova, što znači da krvne žile i okolna područja zdrave kože ne očituju akrolein (Slika 16). U uzorcima kože s najblažim oblikom bolesti (faza regresije vaskulitisa - R) manji broj stanica daje slabo pozitivnu reakciju na akrolein, označenu s 1 bodom (Slike 17 a i b). U uzorcima kože bolesnika s aktivnom fazom bolesti - A nađeno je više akrolein pozitivnih stanica, a pozitivna reakcija na akrolein označena je s 2 boda (Slike 18 a i b). Najviše akrolein pozitivnih stanica nađeno je u koži bolesnika s floridnom fazom vaskulitisa ó F, a izrazito pozitivna reakcija na akrolein označena s 3 boda (Slike 19 a, b i c).



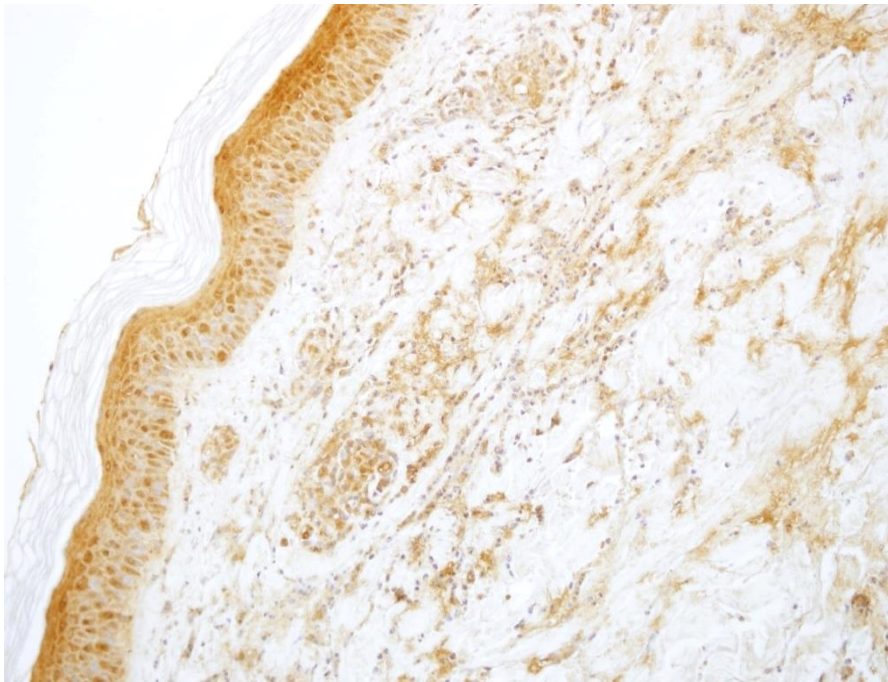
Slika 16. Negativna reakcija malih krvnih žila i okolnih područja na akrolein označena s 0 bodova - klinički zdrava koža (200x)



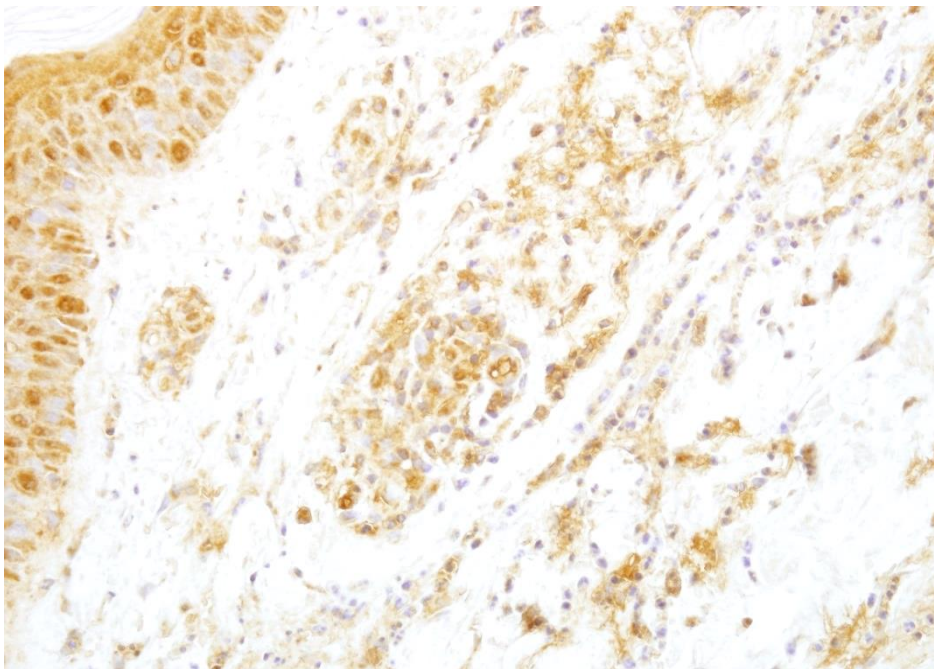
Slika 17. a) Slabo pozitivna reakcija na akrolein označena 1 bodom
ó faza regresije vaskulitisa (R) ó 200x



Slika 17. b) Slabo pozitivna reakcija endotelnih stanica, stijenki MKfi i okolnog dermisa na
akrolein označena 1 bodom ó faza regresije vaskulitisa (R) ó 400x



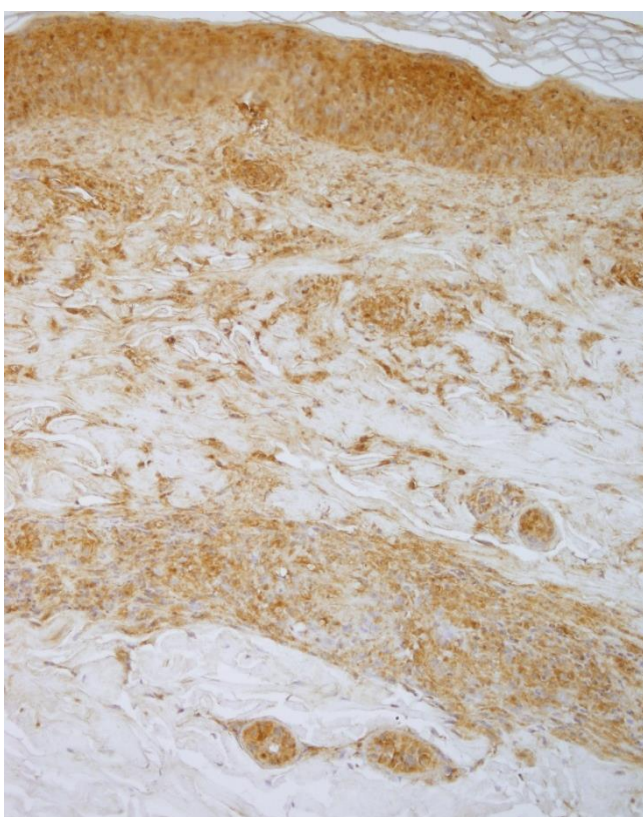
Slika 18. a) Pozitivna reakcija na akrolein označena s 2 boda
ó aktivna faza vaskulitisa (A) ó 200x



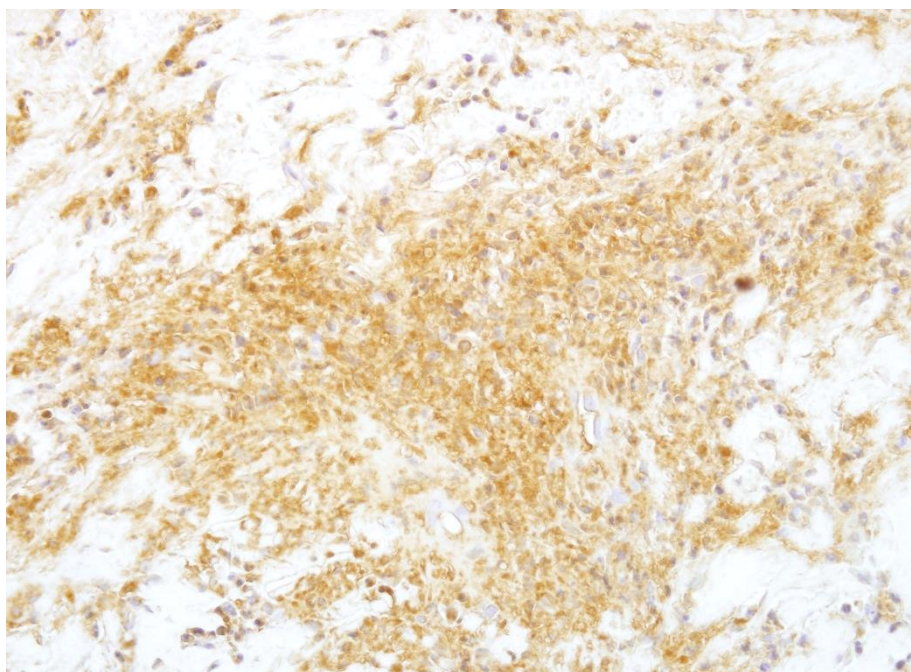
Slika 18. b) Pozitivna reakcija na akrolein označena s 2 boda ó aktivna faza vaskulitisa (A) ó 400x. Pozitivnu reakciju daju endotelne stanice, fragmentirane i oštećene upalne stanice.



Slika 19. a) Izrazito pozitivna reakcija na akrolein označena s 3 boda - floridna faza vaskulitisa (F) - 100x



Slika 19. b) Izrazito pozitivna reakcija na akrolein (MKfi i okolni dermis) označena s 3 boda - floridna faza vaskulitisa (F) - 200x



Slika 19. c) Izrazito pozitivna reakcija na akrolein označena s 3 boda - floridna faza vaskulitisa (F) - 400x. Pozitivnu reakciju daju endotelne stanice i brojne fragmentirane i oštećene upalne stanice u okolnom dermisu.

U biopsatima kofe bolesnika s KLCV (n=67) akrolein pozitivne stanice nađene su u svih 67 uzoraka (100%). U biopsatima zdrave kofe (n=30) akrolein pozitivne stanice su nađene u 5 uzoraka (16,67%). Razlika je statistički značajna ($\chi^2 = 75.22$, df = 1, p = 0; p < 0,01) (Tablica 11).

Tablica 11. Ekspresija akroleina u stanicama kofe zdravih ispitanika i bolesnika s KLCV

Ispitanici	Akrolein		Ukupno
	Negativan	Pozitivan	
Zdravi	25	5	30
Vaskulitis	0	67*	67
Ukupno	25	72	97

* p < 0,01

Intenzitet imunohistokemijske reakcije ekspresije akroleina ovisio je o fazi bolesti. Od 11 bolesnika s floridnom fazom vaskulitisa (F), 2 bolesnika (18,18%) je imalo intenzitet reakcije 2, a 9 bolesnika (81,82%) intenzitet reakcije 3.

Od ukupno 45 bolesnika u aktivnoj fazi vaskulitisa (A), niti jedan nije imao negativnu reakciju na akrolein, 2 bolesnika (4,44%) su imala intenzitet reakcije 1, 32 bolesnika

(71,11%) su imala intenzitet reakcije 2, a 11 bolesnika (24,44%) je imalo intenzitet reakcije 3.

Od 11 bolesnika u fazi regresije vaskulitisa (R), 5 bolesnika (45,45%) je imalo intenzitet reakcije 1, 5 bolesnika (45,45%) intenzitet reakcije 2, a samo jedan bolesnik (9,09%) intenzitet reakcije 3. Razlika je statistički značajna ($\chi^2 = 31.588$, $df = 4$, $p = 0,00000232$; ** $p < 0,00001$) (Tablica 12).

Tablica 12. Intenzitet reakcije ekspresije akroleina prema stupnju bolesti

*Intenzitet reakcije ekspresije akroleina					
Faza bolesti	0	1	2	3	Ukupno
1.floridna	0	0	2	9	11
2.aktivna	0	2	32	11	45
3.regresija	0	5	5	1**	11
Ukupno	0	7	39	21	67

*Intenzitet reakcije je izražen bodovima (v. tablicu 4., str.39).

** $p < 0,00001$

4.7 Opći podaci o prospektivnim bolesnicima kojima je učinjena analiza koncentracije peroksida i antioksidacijskog potencijala u serumu

U prospektivni dio rada uključeno je 30 bolesnika s VMKfi. Prospektivnim je ispitanicima uz imunohistokemijsku analizu akroleina na biopatima kofe, učinjena i analiza ukupnog oksidacijskog kapaciteta (TOC) i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) u serumu.

Podaci o prospektivnim bolesnicima kojima je učinjena analiza koncentracije peroksida u serumu prikazani su u tablici 13. U toj skupini bilo je 15 muškaraca (50 %) i 15 žena (50 %). Prosječna životna dob bila je $56,63 \pm 16,85$ godina, u rasponu od 19 do 79 godina. Prosječno trajanje bolesti bilo je $8,7 \pm 15,6$ mjeseci, u rasponu od 1 dan do 6 godina.

Od ukupno 30 prospektivnih bolesnika s VMKfi, 24 bolesnika (80%) je imalo pridruženu kroničnu bolest, a 1 bolesnik (3,33%) je imao pridruženu zloćudnu bolest (patohistološki verificiran hepatocelularni karcinom u sklopu pridružene kronične infekcije *virusom hepatitis C*). Jedan je bolesnik (3,33%) u anamnestičkim podacima iskazao naviku redovitog konzumiranja alkohola, a 7 bolesnika (23,33%) su pušači. Od ukupno 30 prospektivnih bolesnika, 28 (93,33%) ih je imalo pridružene znakove sistemske bolesti.

Jedan bolesnik (3,33% od ukupnog broja prospektivnih bolesnika s VMKfi) je u tijeku praćenja bolesti preminuo zbog komplikacija sistemskog vaskulitisa.

Podaci o prospektivnim bolesnicima s VMKfi kojima je učinjena analiza ukupnog oksidacijskog potencijala (TOC) i ukupnog antioksidacijskog potencijala u serumu (TAC) prikazani su u tablici 13.

Kontrolnu skupinu činilo je 30 zdravih ispitanika, koji nemaju vaskulitis, imaju klinički zdravu koflu, ne puše, ne konzumiraju alkohol, niti uzimaju bilo kakve lijekove, a koji su po dobi i spolu bili prisposobivi prospektivnoj skupini bolesnika s vaskulitisom.

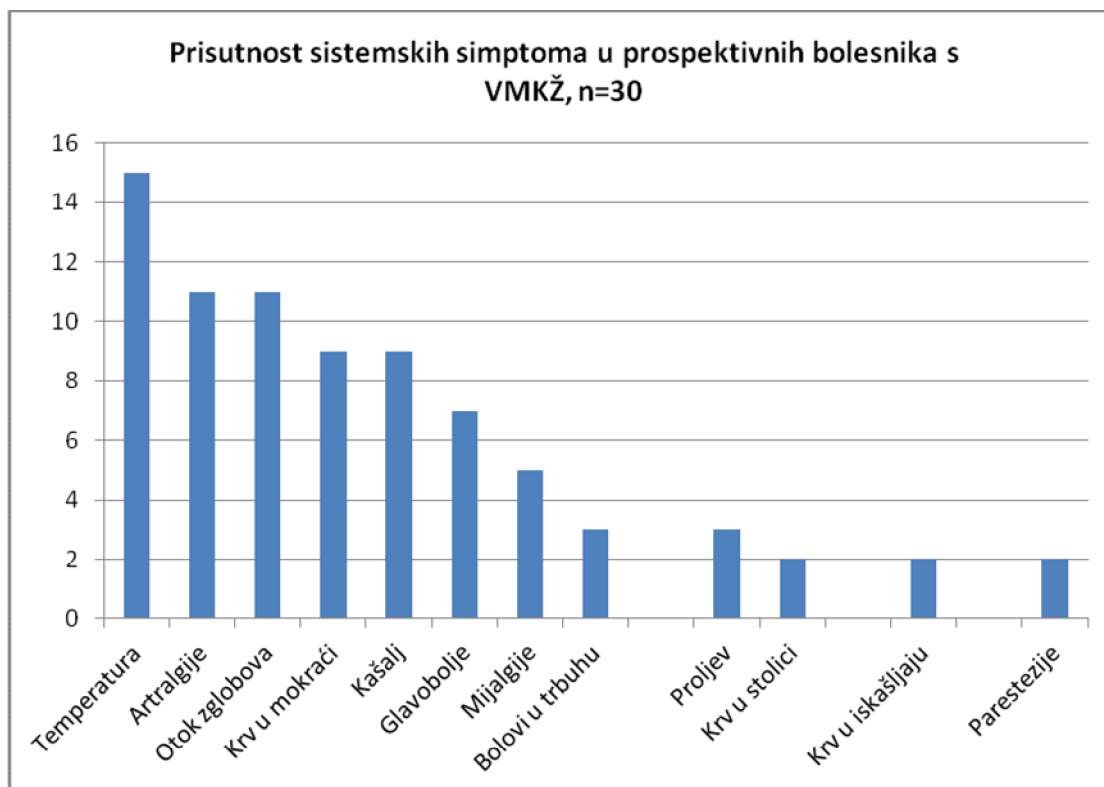
Tablica 13. Prikaz op ih podataka o prospektivnim bolesnicima kojima je u injena analiza ukupnog oksidacijskog kapaciteta (TOC) i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) (n=broj ispitanika, a u zagradi je izraffen postotak)

KARAKTERISTIKE BOLESNIKA	n	(%)
Broj bolesnika	30	
Spol bolesnika		
Mu-ki	15	
fienski	15	
Dob bolesnika (godine)		
Prosjek	56,63	
Raspon	19-79	
Trajanje bolesti		
Prosjek	8,7 mjeseci	
Raspon	1 dan ó 6 godina	
Bolesnici s vaskulitisom razvrstani prema fazi bolesti	30	
1. floridna faza (F)	5	(16,67%)
2. aktivna faza (A)	20	(66,66%)
3. faza regresije (R)	5	(16,67%)
Pridružena kronična bolest		
Da	24	(80%)
Ne	6	(20%)
Pridružena zloćudna bolest		
Da	1	(3,33%)
Ne	29	(96,67%)
Pušenje		
Da	7	(23,33%)
Ne	23	(76,67%)
Alkohol		
Da	1	(3,33%)
Ne	29	96,67%
Pridruženi znaci sistemskog vaskulitisa		
Da	28	(93,33%)
Ne	2	(6,67%)
Letalni ishod bolesti		
Da	1	(3,33%)
Ne	29	(96,67%)

Naj e- i pridruzeni sistemski simptom u prospektivnih bolesnika s VMKfi je povi-ena tjelesna temperatura (u 50% prospektivnih ispitanika). Na drugom mjestu po u estalosti simptoma sistemskog vaskulitisa u prospektivnih bolesnika su artralgiije (36,67%) i otok zglobova (36,67%). 30% prospektivnih bolesnika anamnesti ki je iskazivalo simptome ka-lja i prisutnosti krvi u mokra i,a 23,33% prospektivnih bolesnika simptom glavobolje. Me u rje im sistemskim simptomima u prospektivnih bolesnika zabiljeffene su mijalgije (16,67% bolesnika), bolovi u trbuhu (10% bolesnika), proljev (10% bolesnika), prisutnost krvi u stolici (6,67% bolesnika), prisutnost krvi u iska-ljaju (6,67% bolesnika) i parestezije (6,67% bolesnika). Podaci o prisutnost simptoma sistemskog vaskulitisa u prospektivnih ispitanika prikazani su u tablici 14 i na slici 20.

Tablica 14. Prisutnost simptoma sistemskog vaskulitisa u prospektivnih ispitanika (n = broj ispitanika, a u zagradi je izražen postotak)

KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	n	(%)
Broj ispitanika	30	
Temperatura		
Da	15	(50%)
Ne	15	(50%)
Artralgije		
Da	11	(36,67%)
Ne	19	(63,33%)
Otok zglobova		
Da	11	(36,67%)
Ne	19	(63,33%)
Prisutnost krvi u mokraći		
Da	9	(30%)
Ne	21	(70%)
Kašalj		
Da	9	(30%)
Ne	21	(70%)
Glavobolje		
Da	7	(23,33%)
Ne	13	(43,33%)
Mijalgije		
Da	5	(16,67%)
Ne	25	(83,33%)
Bolovi u trbuhu		
Da	3	(10%)
Ne	27	(90%)
Proljev		
Da	3	(10%)
Ne	27	(90%)
Prisutnost krvi u stolici		
Da	2	(6,67%)
Ne	28	(93,33%)
Prisutnost krvi u iskašljaju		
Da	2	(6,67%)
Ne	28	(93,33%)
Parestezije		
Da	2	(6,67%)
Ne	28	(93,33%)



Slika 20. Uestalost sistemskih simptoma u prospektivnih bolesnika s VMKfi

4.8 Analiza vrijednosti upalnih i biokemijskih parametara između prospektivnih bolesnika s VMKŽ i zdravih ispitanika

Usporedna analiza vrijednosti u 30 prospektivnih bolesnika s VMKfi i 30 zdravih ispitanika iz kontrolne skupine u injena je za slijede e upalne i biokemijske parametre:

CRP, Er, Hgb, Htc, MCV, MCH, MCHC, RDW, Fe, UIBC, TIBC, feritin, Trc, MPV, Leu, neutrofili (Neut aps), limfociti (Limfo aps), monociti (Mono aps), eozinofili (Eos aps), bazofili (Bazo aps), GUK, TRIG, kolesterol (CHOL), HDL, LDL, urea, kreatinin (CREAT), urat, K, Na, Cl, Ca, fosfati (PHOS), ukupni bilirubin (uk.BIL), AST, ALT, GGT, ALP, LDH, CK, ukupni proteini (UK PROT), albumini (ALB) (Tablica 15).

Tablica 15. Usporedna analiza vrijednosti upalnih i biokemijskih parametara izme u prospektivnih bolesnika s VMKfi i zdravih ispitanika

Parametar	Ref. interval	Kontrole	VMKZ			
			Sve faze	Floridna faza	Aktivna faza	Faza regres.
GUK	4,4-6,4 mmol/L	6.07 ± 0.24	6.17 ± 0.50	7.76 ± 1.28	5.56 ± 0.54 +	7.38 ± 1.84
UREA	2,8-8,3 mmol/L	6.86 ± 0.43	12.52 ± 1.71 *	14.47 ± 2.60 *	13.11 ± 2.48 *	8.28 ± 2.61 +
CREAT	63-107 μmol/L	92.00 ± 3.55	210.04 ± 37.03 *	164.43 ± 43.93 *	261.07 ± 57.88 *	100.40 ± 13.02 + #
URAT	134-337 μmol/L	324.67 ± 17.62	390.22 ± 30.31 +	532.00 ± 87.40 * #	359.71 ± 27.01 +	319.75 ± 61.87 +
UK PROT	60-81 g/L	70.61 ± 2.44	68.26 ± 1.69	65.00 ± 3.70	67.93 ± 1.82	73.50 ± 5.81
ALB	41-52 g/L	42.63 ± 1.60	38.41 ± 1.50	38.30 ± 3.64	36.70 ± 1.32 *	48.00 ± 5.00
uk BIL	3-20 μmol/L	16.86 ± 4.28	17.08 ± 5.04	15.45 ± 3.33	11.50 ± 2.11	46.37 ± 38.07
TRIG	1,7 mmol/L	1.63 ± 0.33	2.32 ± 0.49	2.88 ± 0.87	2.38 ± 0.67	0.80 ± 0.11 +
CHOL	5,0 mmol/L	4.84 ± 0.29	5.06 ± 0.34	5.68 ± 0.98	4.76 ± 0.40	5.64 ± 0.21
HDL	1,0 mmol/L	1.38 ± 0.10	1.23 ± 0.11	1.40 ± 0.27	1.11 ± 0.10 *	1.88 ± 0.00
LDL	3,0 mmol/L	2.79 ± 0.29	2.85 ± 0.28	3.28 ± 0.82	2.55 ± 0.21	3.55 ± 0.00
K	3,9-5,1 mmol/L	4.35 ± 0.07	4.57 ± 0.13	4.59 ± 0.32	4.60 ± 0.18	4.74 ± 0.32
Na	137-146 mmol/L	141.56 ± 0.43	138.85 ± 0.94	139.86 ± 2.12	138.67 ± 1.27	137.00 ± 1.48
Cl	97-108 mmol/L	105.05 ± 0.65	103.67 ± 0.96	104.75 ± 3.54	103.57 ± 1.06	102.67 ± 2.19
Ca	2,14-2,65 mmol/L	2.44 ± 0.02	2.35 ± 0.05	2.42 ± 0.11	2.28 ± 0.05	2.50 ± 0.12
PHOS	0,79-1,42 mmol/L	1.05 ± 0.03	1.36 ± 0.07	1.34 ± 0.15	1.38 ± 0.08	1.28 ± 0.17
AST	11-38 U/L	29.68 ± 3.71	41.96 ± 20.90	25.14 ± 5.62	18.80 ± 2.40	129.80 ± 108.06
ALT	12-48 U/L	28.65 ± 3.33	32.23 ± 7.52	26.00 ± 4.12	23.93 ± 4.41	60.60 ± 36.99
LDH	0-241 U/L	185.96 ± 6.09	221.04 ± 25.19	246.00 ± 55.36	190.93 ± 17.35	283.40 ± 97.21
CK	0-177 U/L	154.14 ± 40.52	52.06 ± 9.23 *	42.60 ± 6.01 *	51.27 ± 12.99 *	70.00 ± 30.01
GGT	9-35 U/L	43.43 ± 10.97	69.12 ± 16.56	53.83 ± 20.12	64.20 ± 20.10	110.50 ± 70.08
ALP	64-153 U/L	80.12 ± 7.43	88.96 ± 9.64	76.00 ± 9.38	89.47 ± 14.49	106.50 ± 23.74

Fe	8-30 µmol/L	17.01 ± 1.66	10.16 ± 1.92 *	16.55 ± 4.48 #	8.18 ± 2.25 * +	10.30 ± 3.20 *
UIBC	26-59 µmol/L	42.83 ± 2.73	37.83 ± 3.60	27.15 ± 6.14 *	37.48 ± 3.00	61.30 ± 19.70
TIBC	49-75 µmol/L	59.77 ± 2.35	48.41 ± 3.35 *	43.70 ± 2.93 *	46.11 ± 3.43 *	71.60 ± 16.50 +
CRP	5,0 mg/L	2.14 ± 0.24	45.88 ± 14.39 * +	12.96 ± 8.14 * #	69.14 ± 21.48 * +	13.46 ± 7.94 * + #
Feritin	20-200µg/L	108.27 ± 26.14	510.65 ± 128.37 *	917.75 ± 311.40 *	449.91 ± 139.91 *	30.50 ± 22.50 * + #
Leu	3,4-9,7x10 ⁹ /L	6.16 ± 0.25	10.34 ± 0.87 *	12.93 ± 2.23 *	10.21 ± 0.84 *	8.46 ± 2.37
Er	4,34-5,72x10 ¹² /L	4.43 ± 0.08	3.92 ± 0.14	4.05 ± 0.31	3.66 ± 0.15	4.43 ± 0.32
Hgb	138-175 g/L	132.14 ± 2.69	115.73 ± 4.19 *	123.29 ± 7.38	106.73 ± 5.06 *	130.00 ± 7.77 #
Htc	0,415-0,53L/L	4.68 ± 4.29	0.35 ± 0.01 *	0.37 ± 0.02 *	0.32 ± 0.01 *	0.40 ± 0.02 * #
MCV	83-97,2fL	89.71 ± 0.87	89.21 ± 0.88	92.70 ± 1.59	88.11 ± 1.03	90.14 ± 2.75
MCH	27,4-33,9 pg	29.82 ± 0.36	29.31 ± 0.28	30.33 ± 0.43	29.03 ± 0.37	29.52 ± 0.87
MCHC	320-345 g/L	332.27 ± 1.37	328.84 ± 1.69	327.17 ± 3.57	329.47 ± 2.37	328.80 ± 2.58
RDW	9-15%	13.62 ± 0.18	14.53 ± 0.41	14.10 ± 0.75	14.26 ± 0.44	15.23 ± 1.30
Trc	158-424 x10 ⁹ /L	218.97 ± 11.19	284.46 ± 25.61 *	285.57 ± 53.99	290.80 ± 35.38 *	311.20 ± 68.11 *
MPV	6,8-10,4 fL	7.97 ± 0.17	8.01 ± 0.29	8.35 ± 0.91	8.17 ± 0.31	6.98 ± 0.15 *
Neut aps	2,06-6,49 x10 ⁹ /L	3.77 ± 0.23	8.51 ± 0.84 * #	11.00 ± 2.51 * #	77.81 ± 2.41 * +	73.95 ± 6.03 * +
Limfo aps	1,19-3,35 x10 ⁹ /L	1.55 ± 0.09	1.53 ± 0.16 #	2.06 ± 0.58 #	13.99 ± 1.60 * +	16.98 ± 3.78 * +
Mono aps	0,12-0,84 x10 ⁹ /L	0.43 ± 0.02	0.59 ± 0.06 #	0.68 ± 0.21 #	5.93 ± 0.64 * +	5.75 ± 1.13 * +
Eos aps	0-0,43 x10 ⁹ /L	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.02 #	0.09 ± 0.03 #	0.99 ± 0.24 * +	1.18 ± 0.63 * +
Bazo aps	0-0,06 x10 ⁹ /L	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01 #	0.04 ± 0.02 #	0.19 ± 0.04 * +	0.48 ± 0.17 * +

* p<0.05 u odnosu na kontrolu (T-test)

+ p<0.05 u odnosu na floridnu fazu (T-test)

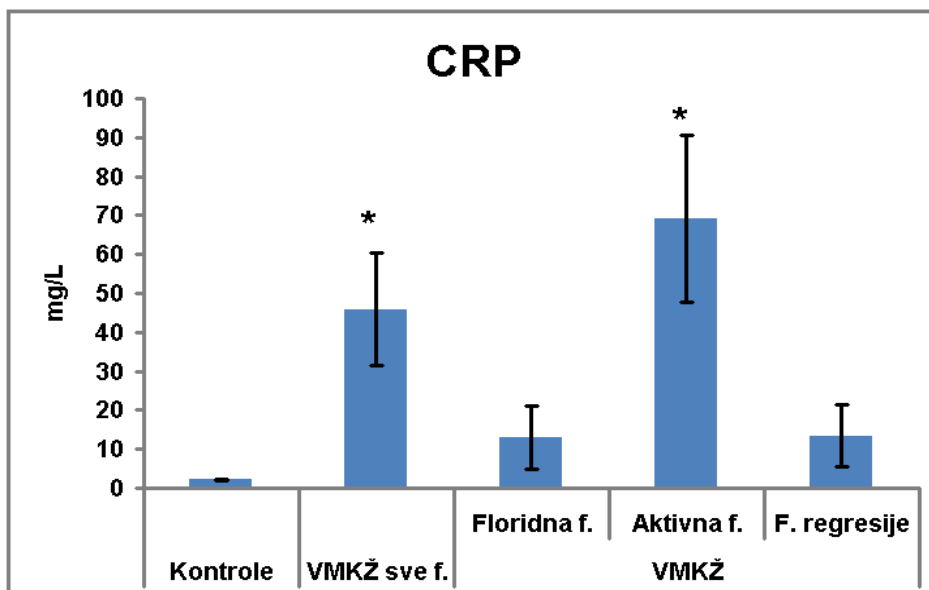
p<0.05 u odnosu na aktivnu fazu (T-test)

Dobiveni rezultati pokazuju da su bolesnici s VMKfi imali značajno povišene vrijednosti CRP, Leu, Neut aps, Mono aps, Trc, feritina, GGT, LDH, ureje, CREAT i PHOS.

Nasuprot tome, bolesnici s VMKfi su imali značajno snižene vrijednosti CK, Hgb, Htc, Fe i TIBC.

4.8.1. ANALIZIRANI UPALNI PARAMETRI POVEZANI S FAZOM AKTIVNOSTI VMKŽ

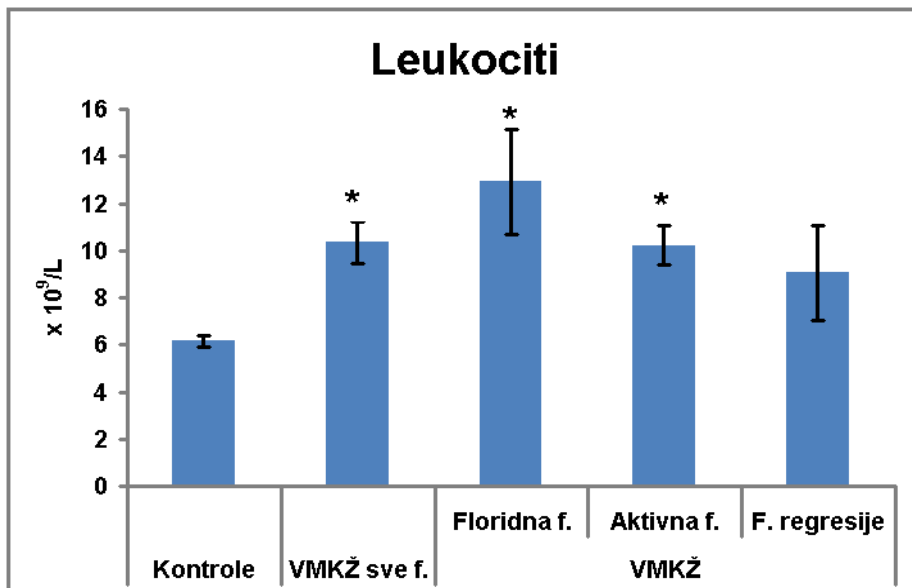
Bolesnici s VMKfi imali su statistički značajno povišene vrijednosti CRP u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T-test, $p=0,0004$; $p<0,05$) (Slika 21 a). Nadalje, vrijednost ovog upalnog parametra ovisila je i o fazi aktivnosti bolesti. Najviše vrijednosti CRP imali su bolesnici s VMKfi u aktivnoj fazi bolesti (T-test, $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu), dok su vrijednost CRP u bolesnika s VMKfi u floridnoj fazi i fazi regresije bile neznatno povišene u odnosu na kontrolnu skupinu (T-test, $p>0,05$) (Slika 21 a).



* $p<0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Slika 21 a). Usporedni prikaz vrijednosti CRP u serumu zdravih ispitanika ($n=30$) i bolesnika s VMKfi ($n=30$) i usporedni prikaz vrijednosti CRP u bolesnika s VMKfi prema fazama aktivnosti bolesti

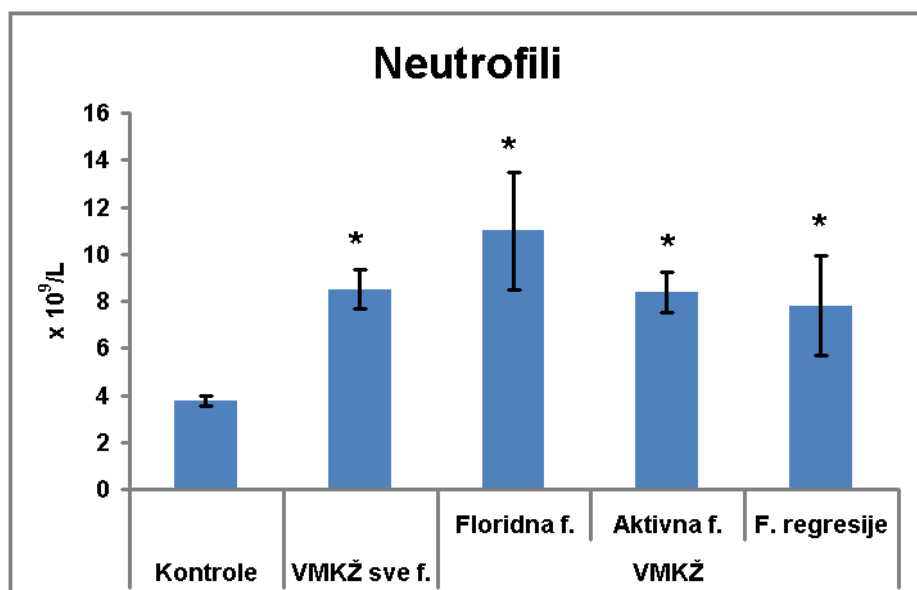
Svi bolesnici s VMKfi imali su statisti ki zna ajno povi-en broj leukocita u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T-test, $p<0,05$) (Slika 21 b). Nadalje, vrijednost ovog upalnog parametra ovisila je i o fazi aktivnosti bolesti. Najvi-e vrijednosti leukocita imali su bolesnici s VMKfi u floridnoj fazi bolesti (T-test, $p=1,40684E-06$; $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu) (Slika 21 b). Sa regresijom bolesti vrijednosti leukocita su se sniavale prema kontrolnim vrijednostima (T-test, $p>0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu) (Slika 21 b).



* $p<0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Slika 21 b). Usporedni prikaz vrijednosti leukocita u krvi zdravih ispitanika ($n=30$) i bolesnika s VMKfi ($n=30$) i usporedni prikaz vrijednosti leukocita u bolesnika s VMKfi razvrstanih prema fazama aktivnosti bolesti

Bolesnici s VMKfi imali su u diferencijalnoj krvnoj slici statisti ki zna ajno povi-ene vrijednosti neutrofila u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T-test, $p=1,76587E-06$; $p<0,05$) (Slika 21 c). Vrijednost ovog upalnog parametra ovisila je i o fazi aktivnosti bolesti. Najvi-e vrijednosti neutrofila imali su bolesnici s VMKfi u floridnoj fazi bolesti (T-test, $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu) (Slika 21 c).

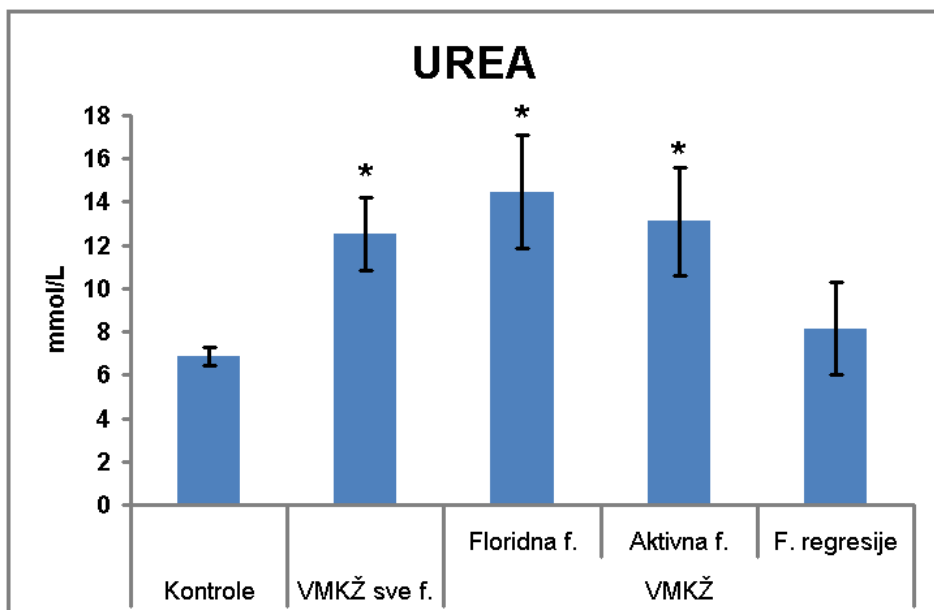


* $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Slika 21 c). Usporedni prikaz vrijednosti neutrofila u krvi zdravih ispitanika ($n=30$) i bolesnika s VMKfi ($n=30$) i usporedni prikaz vrijednosti neutrofila u bolesnika s VMKfi razvrstanih prema fazama aktivnosti bolesti

4.8.2. ANALIZIRANI BIOKEMIJSKI PARAMETRI POVEZANI S FAZOM AKTIVNOSTI VMKŽ KOJI UKAZUJU NA POREMEĆAJ BUBREŽNE FUNKCIJE

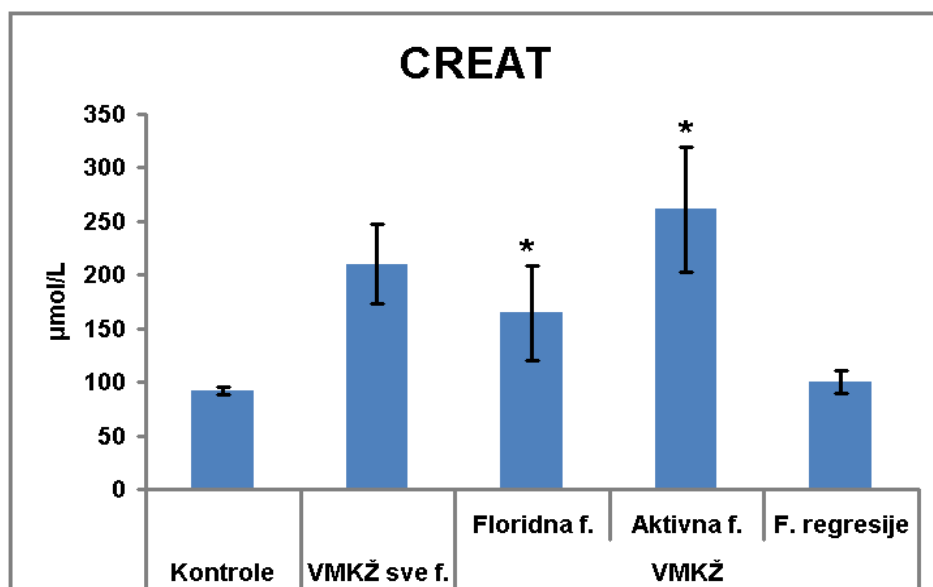
Bolesnici s VMKfi imali su statistički značajno povišene vrijednosti ureje, ukazuje na poremećaj funkcije bubrega, u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T-test, $p=0,000479$; $p < 0,05$) (Slika 22 a). Nadalje, vrijednost ureje ovisila je i o fazi aktivnosti bolesti. Među bolesnicima s VMKfi najviše vrijednosti ureje imali su bolesnici u floridnoj fazi bolesti (T-test, $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu) (Slika 22 a). S regresijom bolesti vrijednosti ureje su se vraćale prema kontrolnim vrijednostima (T-test, $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu).



* $p < 0.05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Slika 22 a). Usporedni prikaz vrijednosti ureje u serumu zdravih ispitanika ($n=30$) i bolesnika s VMKfi ($n=30$) i usporedni prikaz vrijednosti ureje u bolesnika s VMKfi razvrstanih prema fazama aktivnosti bolesti

Bolesnici s VMKfi imali su statistički značajno povišene vrijednosti kreatinina, parametra koji ukazuje na oštećenje bubrežne funkcije, u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T-test, $p=0,000509$; $p < 0,05$) (Slika 22 b). Vrijednost ovog biokemijskog parametra ovisila je i o fazi aktivnosti bolesti. Najviše vrijednosti kreatinina imali su bolesnici s VMKfi u aktivnoj fazi bolesti (T-test, $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu) (Slika 22 b).

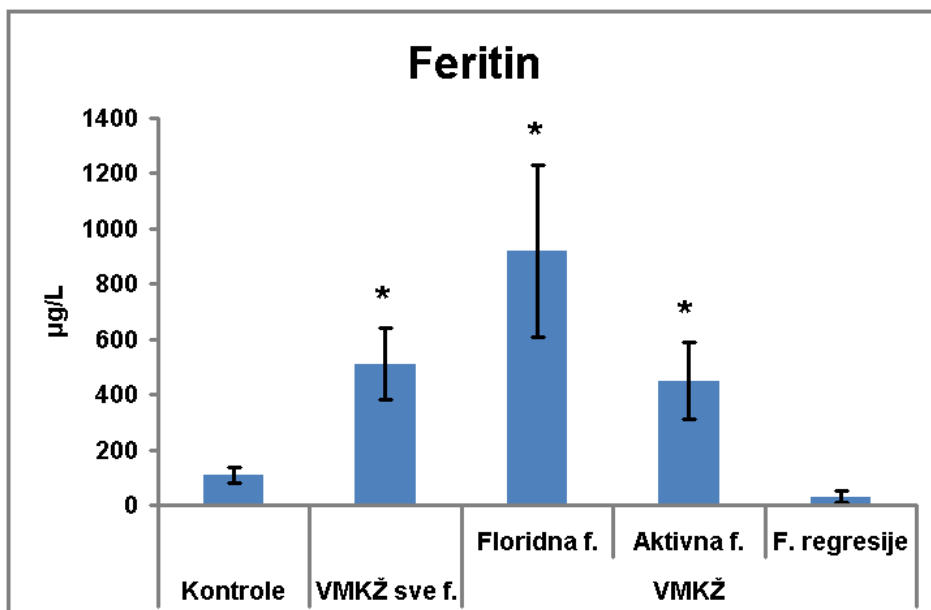


* $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Slika 22 b). Usporedni prikaz vrijednosti kreatinina u serumu zdravih ispitanika ($n=30$) i bolesnika s VMKfi ($n=30$) i usporedni prikaz vrijednosti kreatinina u bolesnika s VMKfi razvrstanih prema fazama aktivnosti bolesti.

4.8.3. ANALIZIRANI BIOKEMIJSKI PARAMETRI POVEZANI S FAZOM AKTIVNOSTI VMKŽ KOJI UKAZUJU NA POREMEĆAJ METABOLIZMA ŽELJEZA

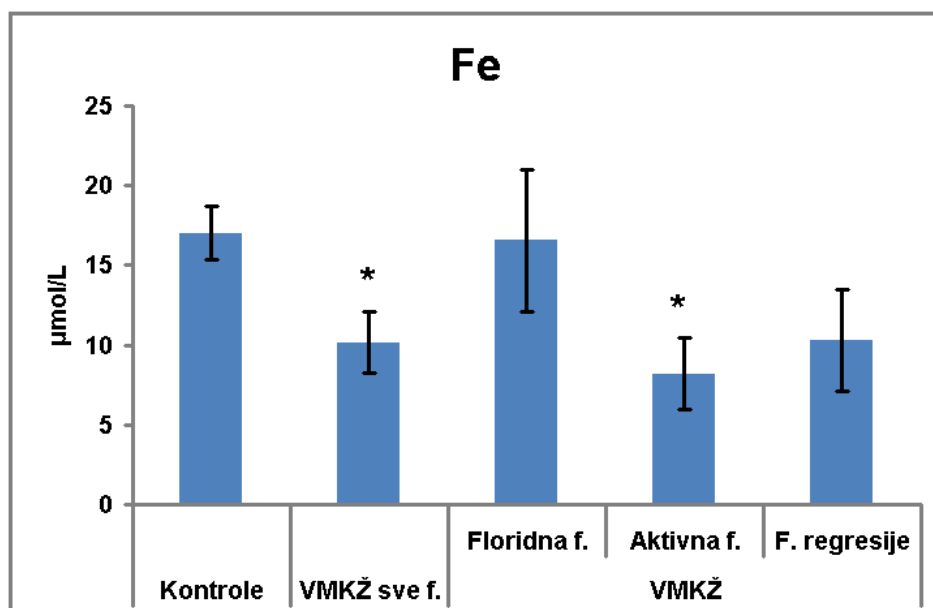
Bolesnici s VMKfi imali su statistički značajno povišene vrijednosti feritina, parametra koji ukazuje na poremećaj metabolizma željeza, u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T-test, $p=0,019774$; $p < 0,05$) (Slika 23 a). Vrijednost ovog parametra ovisila je i o fazi aktivnosti bolesti. Među bolesnicima s VMKfi najviše vrijednosti feritina imali su bolesnici u floridnoj fazi bolesti (T-test, $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu) (Slika 23 a). Sa regresijom bolesti vrijednosti feritina su se vraćale prema normalnim vrijednostima (T-test, $p > 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu).



* $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Slika 23 a). Usporedni prikaz vrijednosti feritina u serumu zdravih ispitanika ($n=30$) i bolesnika s VMKfi ($n=30$) i usporedni prikaz vrijednosti feritina u bolesnika s VMKfi razvrstanih prema fazama aktivnosti bolesti

Bolesnici s VMKfi imali su statisti ki zna ajno snižene vrijednosti željeza (Fe), u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T-test, $p=0,011749$; $p < 0,05$) (Slika 23 b). Vrijednost ovog parametra ovisila je i o fazi aktivnosti bolesti. Me u bolesnicima s VMKfi najviše vrijednosti Fe imali su bolesnici u floridnoj fazi bolesti, a najniže vrijednosti Fe bolesnici u aktivnoj fazi bolesti (za obje grupe T-test, $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu) (Slika 23 b).



* $p < 0,05$ u usporedbi s kontrolnom skupinom

Slika 23 b). Usporedni prikaz vrijednosti Fe u serumu zdravih ispitanika ($n=30$) i bolesnika s VMKfi ($n=30$) i usporedni prikaz vrijednosti Fe u bolesnika s VMKfi razvrstanih prema fazama aktivnosti bolesti

4.8.4. KORELACIJE MEĐU ANALIZIRANIM UPALNIM I BIOKEMIJSKIM PARAMETRIMA U BOLESNIKA S VMKŽ I ZDRAVIH ISPITANIKA

Korelacija me u pojedinim upalnim i biokemijskim parametrima utvrđena je Pearsonovom korelacijom.

Pozitivne korelacijske koeficijente i P vrijednosti ispod 0,050 imali su parovi ispitivanih varijabli s dokazanim usporednim rastom vrijednosti.

Negativne korelacijske koeficijente i P vrijednosti ispod 0,050 imali su parovi ispitivanih varijabli u kojima se rastom vrijednosti jedne varijable, vrijednost druge varijable smanjivala.

Za parove varijabli s P vrijednosti iznad 0,050 nije nađena statistički značajna korelacija između ispitivanih varijabli.

Značajne korelacije pojedinih parametara u bolesnika s VMKfi i zdrave kontrolne skupine su prikazani u tablicama 16, 17, 18 i 19. Zasebno su prikazani parametri koji su pozitivnoj korelaciji i parametri koji su u negativnoj korelaciji.

Pozitivna korelacija u bolesnika s VMKfi utvrđena je među slijedećim analiziranim upalnim i biokemijskim parametrima: urea vs. CREAT, urea vs. PHOS, CREAT vs. PHOS, LDH vs. GGT, CK vs. TIBC, Fe vs. Hgb, Fe vs. Htc, Hgb vs. Htc, Hgb vs. broj limfocita, Htc vs. broj limfocita, broj limfocita vs. broj monocita i broj limfocita vs. broj bazofila (Pearsonova korelacija, $p < 0,01$) (Tablica 16).

Tablica 16. Pozitivna korelacija pojedinih parametara u bolesnika s VMKfi (Pearsonova korelacija)

Korelirani parametri	Koeficijent korelacije	Značajnost (p vrijednost)
UREA vs CREAT	0.818	0.000000608
BIL uk vs TRIG	0.625	0.00557
TRIG vs CHOL	0.76	0.000252
CHOL vs LDL	0.81	0.000787
CHOL vs Ca	0.655	0.00429
Na vs Cl	0.552	0.00941
UREA vs PHOS	0.698	0.00126
CREAT vs PHOS	0.669	0.00174
BIL uk vs AST	0.952	3.12E-09
BIL uk vs ALT	0.923	3.62E-10
BIL uk vs LDH	0.698	0.000302
BIL uk vs GGT	0.601	0.00244
AST vs ALT	0.931	5.77E-09
AST vs LDH	0.725	0.0000409
AST vs GGT	0.634	0.000672
ALT vs LDH	0.689	0.000139
ALT vs GGT	0.789	0.00000274
ALT vs ALP	0.534	0.00602
LDH vs GGT	0.523	0.00874
GGT vs ALP	0.719	0.0000509
ALB vs UIBC	0.673	0.00832
UREA vs CREAT	0.818	0.000000608

Korelirani parametri	Koeficijent korelacije	Značajnost (p vrijednost)
ALB vs TIBC	0.73	0.00201
BIK uk vs Fe	0.716	0.00057
TRIG vs Fe	0.701	0.00173
Ca vs TIBC	0.747	0.000565
CK vs TIBC	0.762	0.00246
UIBC vs TIBC	0.835	0.0000306
Ca vs Hgb	0.682	0.000666
Ca vs Htc	0.662	0.00146
Fe vs Hgb	0.738	0.000311
Fe vs Htc	0.721	0.000502
Hgb vs Htc	0.99	6.68E-18
Hgb vs Limfociti	0.685	0.000436
Htc vs Limfociti	0.665	0.000736
Leu vs Neutrofili	0.975	1.57E-11
LDL vs Limfociti	0.729	0.00713
LDL vs Monociti	0.804	0.00163
Fe vs Bazofili	0.721	0.00162
Leu vs monociti	0.581	0.00454
Limfociti vs Monociti	0.84	0.00000102
Limfociti vs Bazofili	0.593	0.00365
Monociti vs Bazofili	0.551	0.00786
ALB vs TIBC	0.73	0.00201

Negativna korelacija u bolesnika s VMKfi utvrđena je među slijedećim analiziranim upalnim i biokemijskim parametrima: urea vs. TIBC, CREAT vs. TIBC, urea vs. Hgb, urea vs. Htc, CREAT vs. Hgb i CREAT vs. Htc (Pearsonova korelacija, $p < 0,01$) (Tablica 17).

Tablica 17. Negativna korelacija pojedinih parametara u bolesnika s VMKfi (Pearsonova korelacija)

Korelirani parametri	Koeficijent korelacije	Značajnost (p vrijednost)
K vs Na	- 0.528	0.0056
K vs Ca	- 0.655	0.00127
Ca vs ALP	- 0.578	0.00606
Na vs CRP	- 0.541	0.0077
UREA vs TIBC	- 0.604	0.00794
CREAT vs TIBC	- 0.59	0.00994
UREA vs HGB	- 0.521	0.00761
UREA vs Htc	- 0.527	0.00673
CREAT vs Hgb	- 0.577	0.00201
CREAT vs Htc	- 0.567	0.00309

Nadalje, pozitivna korelacija u zdravih ispitanika utvrđena je među slijedećim analiziranim upalnim i biokemijskim parametrima: urea vs. CREAT, urea vs. LDH, CK vs. TIBC, GGT vs. Fe, CREAT vs. Mono aps, Leu vs. Hgb (Pearsonova korelacija, $p < 0,01$) (Tablica 18).

Tablica 18. Pozitivna korelacija pojedinih parametara u kontrolnoj skupini (Pearsonova korelacija)

Korelirani parametri	Koeficijent korelacije	Značajnost (p vrijednost)
UREA vs CREAT	0.567	0.000387
ALB vs Ca	0.751	0.00306
CHOL vs LDL	0.976	1.26E-08
UREA vs AST	0.475	0.00451
UREA vs LDH	0.52	0.00453
BIL uk vs AST	0.871	6.49E-08
BIL uk vs Fe	0.725	0.00336
AST vs ALT	0.653	0.0000284
AST vs Fe	0.666	0.00351
ALT vs Fe	0.608	0.00958
LDH vs ALP	0.542	0.00761

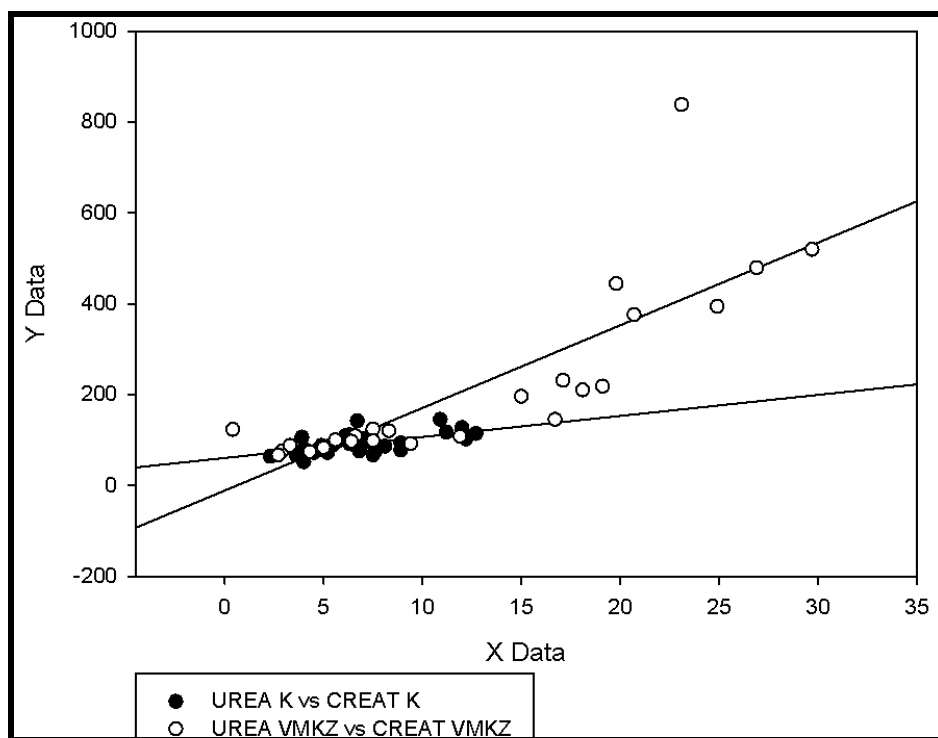
Korelirani parametri	Koeficijent korelacije	Značajnost (p vrijednost)
GGT vs ALP	0.902	7.09E-10
GGT vs Fe	0.719	0.00114
ALB vs Hgb	0.783	0.000339
Ca vs Eritrociti	0.65	0.00191
Ca vs Hgb	0.704	0.000527
UIBC vs TIBC	0.768	0.000507
CK vs TIBC	0.821	0.000581
Leu vs Hgb	0.426	0.00849
Er vs Hgb	0.81	1.28E-09
Leu vs Neutrofili	0.925	3.53E-11
Leu vs Monociti	0.487	0.00474

Negativna korelacija u zdravih ispitanika utvrđena je među slijedećim analiziranim upalnim i biokemijskim parametrima: GGT vs. Hgb (Pearsonova korelacija, $p < 0,01$) (Tablica 19).

Tablica 19. Negativna korelacija pojedinih parametara u kontrolnoj skupini (Pearsonova korelacija)

Korelirani parametri	Koeficijent korelacije	Značajnost (p vrijednost)
ALB vs PHOS	- 1.000	0.000154
Cl vs Ca	- 0.666	0.00352
ALB vs GGT	- 0.657	0.00573
GGT vs Hgb	- 0.498	0.00506
ALP vs Hgb	- 0.550	0.00443
AST vs Trc	- 0.508	0.00218

Analizom vrijednosti dobivenih korištenjem statističkog testa Pearsonove korelacije uočene su bitne promjene u korelaciji UREA vs CREAT između kontrolne skupine i skupine bolesnika s VMKfi (Slika 24).

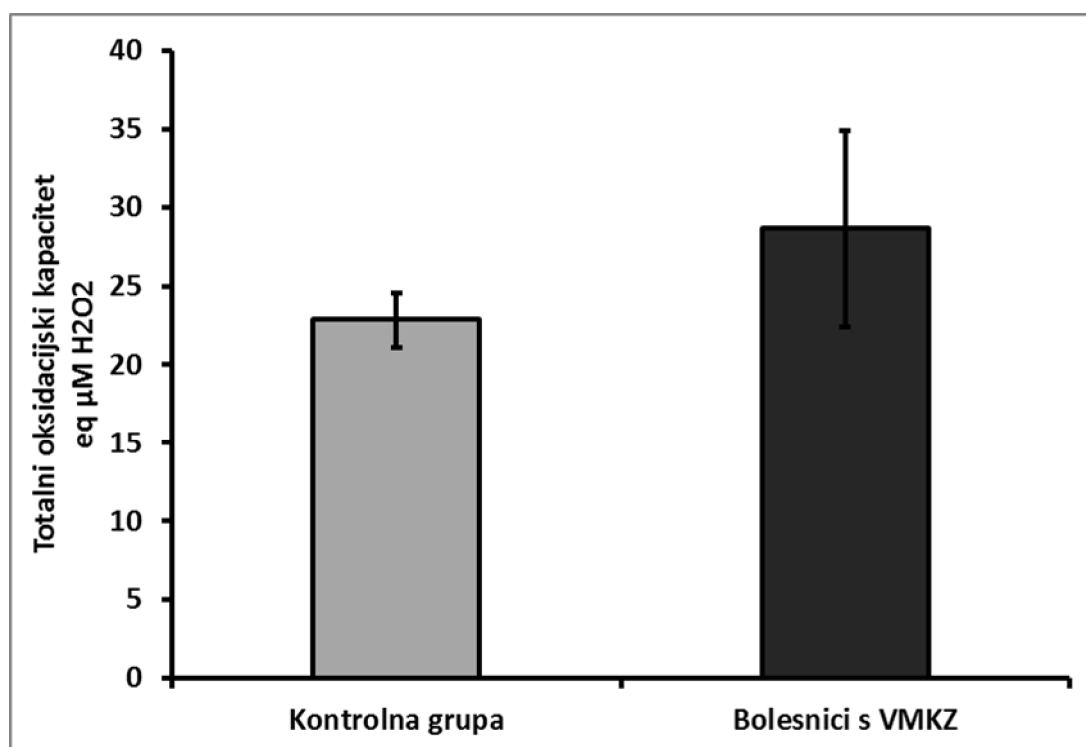


Slika 24. Promjena vrijednosti Pearsonove korelacije parametara UREA vs. CREAT u bolesnika s VMKfi u odnosu na kontrolnu skupinu

4.9 Ukupni oksidacijski kapacitet (TOC) u bolesnika s VMKŽ i zdravih ispitanika

U serumima zdravih ispitanika (n=30) i bolesnika s VMKfi (n=30) određena je koncentracija peroksida (H_2O_2 /mM), koji je mjera oksidacijskog stresa. Vrijednosti H_2O_2 su određene iz baždarnih krivulje (v. poglavlje 3. Ispitanici i metode; Slika 14, str. 43).

Bolesnici s VMKfi imali su povišene vrijednosti koncentracije peroksida u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (T test, $p=0,415008$) (Slika 28).

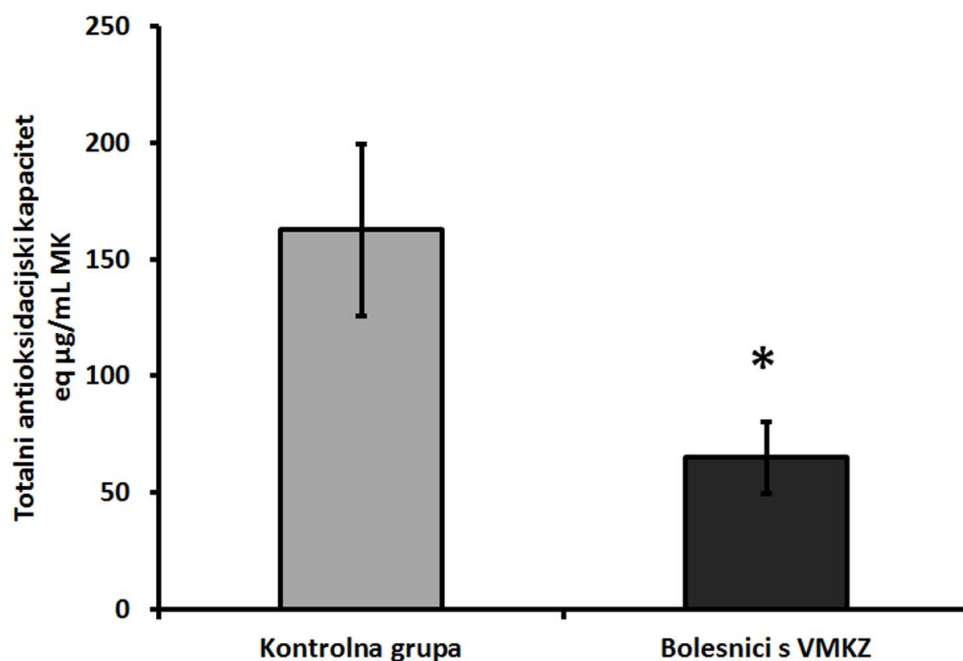


Slika 28. Usporedni prikaz ukupnog oksidacijskog kapaciteta (TOC) u serumu zdravih ispitanika (n=30) i bolesnika s VMKfi (n=30)

4.10 Ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u bolesnika s VMKŽ i zdravih ispitanika

U serumima zdravih ispitanika (n=30) i bolesnika s VMKfi (n=30) odre en je ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC). Vrijednosti TAC-a odre ene su na temelju bařdarne krivulje (v. poglavlje 3. Ispitanici i metode; Slika 15, str. 46).

Bolesnici s VMKfi imali su niži ukupni antioksidacijski kapacitet, izražen kao ekvivalent koncentracije mokra ne kiseline (mg/mL), u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika. Razlika je statisti ki zna ajna * (T test, $p = 0,0023179$; $p < 0,05$) (Slika 29).



* $p < 0,05$

Slika 29. Usporedni prikaz ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) u serumu zdravih ispitanika (n=30) i bolesnika s VMKfi (n=30) izražen prema ukupnom antioksidacijskom kapacitetu mokra ne kiseline

5. RASPRAVA

U ovom radu obrađeno je 97 bioptata kofle, među kojima je bilo 37 bioptata kofle retrospektivnih bolesnika s VMKfi (tipa LCV), 30 bioptata kofle prospektivnih bolesnika s VMKfi (tipa LCV) i 30 bioptata kofle zdravih, kontrolnih ispitanika. Uzorke kofle retrospektivnih ispitanika, sačuvane u parafinskim blokovima u razdoblju od 2001. do 2011. godine, za potrebnu analizu ustupio je Klinički zavod za patologiju KB Dubrava u Zagrebu. Uzorci kofle prospektivnih ispitanika prikupljeni su u razdoblju od 2011. do 2012. godine u KB Dubrava Zagreb. Za retrospektivne bolesnike korištena je dostupna pohranjena patohistološka dokumentacija, u kojoj su pronađeni podaci za fazu aktivnosti bolesti, životnu dob i spol ispitanika.

Prosječna životna dob svih ispitanika bila je 56,43 godine \pm 16,4, u rasponu od 19 do 88 godina. Taj je rezultat u skladu s podacima iz literature prema kojima se vaskulitis kofle pojaviti u svakoj životnoj dobi, češće u odrasloj nego u dječjoj (1,2). Ciljna skupina ovog rada bili su ispitanici odrasle dobi, s obzirom da se radi o ciljnoj skupini ispitanika utemeljenoj na bolni kom ustroju ustanove u kojoj je istraživanje provedeno (u KB Dubrava nema odjela pedijatrije). Prosječna životna dob u odraslih bolesnika s VMKfi je prema literaturnim izvještajima 47 godina (23), a maksimalna je incidencija bolesti prema studiji Tidmana i sur. je između 55 i 64 godine (22), što je u skladu s prosječnom životnom dobom naših ispitanika.

Prosječno trajanje bolesti u vrijeme postavljanja dijagnoze bilo je 8,7 mjeseci, u rasponu od 1 dan do 6 godina (72 mjeseca). Rezultat o prosječnom trajanju bolesti u vrijeme postavljanja dijagnoze u bolesnika iz ovog istraživanja potvrđuju i literaturni podaci, prema kojima se trajanje bolesti kreće u rasponu od tjedan dana do 318 mjeseci (25), a većina bolesnika s KLCA ima jednu epizodu bolesti koja spontano prolazi unutar nekoliko tjedana ili mjeseci (26).

S obzirom da sindromi vaskulitisa imaju mnogo različitih prezentacija, nema uniformnog algoritma za evaluaciju dijagnoze svih prezentacija (150), a upravo je procjena aktivnosti bolesti najbitnija odrednica za provođenje dobro dizajniranih kontroliranih kliničkih studija (151). Mnoge studije koje procjenjuju primarni ishod započinjanja i titriranja terapije vaskulitisa, aktivnost bolesti dijele na trajnu remisiju (potpuno odsustvo bolesti), mjerljivo poboljšanje bolesti i relaps (povišenu aktivnost bolesti) (152-156).

Pouzdana podaci o incidenciji VMKfi u Hrvatskoj nisu poznati. Naime, pristup ovim bolesnicima je zbog multisistemske prirode bolesti multidisciplinarnan. Upravo zbog tog

multidisciplinarnog pristupa koji uključuje velik broj liječnika različitih specijalnosti i subspecijalnosti u dijagnostiku i liječenje VMKfi-a, kontroverzi u sustavu nomenklature i klasifikacije bolesti, kao i pomanjkanja univerzalnih, za sve liječnike struke jedinstvenih i jasnih kriterija u određivanju aktivnosti, tijeka i prognoze bolesti, ne postoje jedinstveni registri za ovu bolest. Stoga za sada ne postoje niti pouzdani epidemiološki podaci koji bi olakšali provođenje kontroliranih kliničkih studija i praćenja tijeka bolesti u ovih bolesnika. Za otklapanje je da se boljom i kvalitetnijom interdisciplinarnom suradnjom, za sve liječnike struke formirati jedinstveni registri praćenja vaskulitisa, koji će ujedno i olakšati provođenje kvalitetnih epidemioloških studija o vaskulitisu.

U recentnom razdoblju u KB Dubrava su provedene dvije retrospektivne analize bolesnika s VMKfi (56, 157).

U radu Bacalja i sur. (56) provedena je retrospektivna analiza 52 bolesnika s pauci-imunim glomerulonefritisom za sedmogodišnji period. Pauci - imuni glomerulonefritis karakteriziran je leukocitocitoklastičnim nekrotizirajućim vaskulitisom sa vrlo diskretnim ili potpuno odsutnim imunim depozitima. Pregledani su dostupni klinički, laboratorijski i patohistološki nalazi biopsija bubrežne u arhivi Zavoda za patologiju KB Dubrava Zagreb. U smislu određivanja progresivnosti bolesti svim je bolesnicima određen BVAS indeks (53). Od 52 bolesnika, 29 su bili muškarci, a 23 žene, prosječna životna dob 60,01 u rasponu od 17 do 83 godine. Od 52 bolesnika s ovim tipom vaskulitisa, 18 ih je imalo promjene na bubrežnoj po tipu VMKfi. Od 18 bolesnika s manifestacijama na bubrežnoj, 10 ih je imalo preegzistirajuće promjene na bubrežnoj povezane s VMKfi, a u 8 bolesnika je u tijeku bolesti zbog pojave bubrežnih manifestacija u bubrežnoj biopsiji bubrežne. Najčešći nalaz bio je LCV (u 7 od ukupno 8 u bubrežnoj biopsiji) sa fokalnom fibrinoidnom nekrozom (u 5 od ukupno 8 u bubrežnoj biopsiji). ANCA su bila pozitivna u 46% bolesnika, od toga cANCA u 7,69%, pANCA u 34,6%, a i cANCA i pANCA u 3,8% bolesnika. Gotovo svi bolesnici s bubrežnim manifestacijama VMKfi su imali visok BVAS indeks koji se kretao u rasponu od 12 do 33, osim jednog bolesnika u kojeg je BVAS indeks bio 3 (56).

U radu Tišljara i sur. (157) provedenom 2011. godine u KB Dubrava Zagreb prikupljeni su demografski, laboratorijski, klinički i patohistološki podaci za bolesnike s vaskulitisom malih krvnih žila bubrega iz povijesti bolesti te iz Registra biopsije bubrega u KB Dubrava Zagreb. Od ukupno 61 bolesnika, 33 su bili muškarci i 28 žena, prosječna životna dob 56,9 godina u rasponu od 18 do 83 godine. Gotovo svi bolesnici su prije klinički manifestne bubrežne bolesti imali prodromalnu fazu vaskulitisa praćenu općim simptomima kao što su umor, febrilitet, glavobolje, mijalgije, artralgijske/artritis. Najčešće ekstrarenalne vaskulitise

promjene, na koje su u 37,7% bolesnika, bile su respiratorne tegobe, koje su se manifestirale hemoptizama, epistaksom i rinorejom. Vaskuliti ne kožne promjene, najčešće u obliku purpura na koje su u 22 bolesnika (36% svih bolesnika), a u njih 13 od ukupno 22 učinjena je i biopsija kože kojom je verificiran LCV. U 75% bolesnika na koži je eritrociturija semikvantitativno višeg od 3+. U 20,3% bolesnika proteinurija je bila nefrotskog ranga. Od 32 bolesnika s pozitivnim ANCA protutijelima (52,5%), 23 bolesnika imalo je pozitivno pANCA, a njih 9 cANCA. Prosječni BVAS indeks iznosio je 15,8, raspona 3 - 36. Od 61 bolesnika u 34 je dijagnosticiran MPA, u 19 MPAB (mikroskopski poliangitis ograničen na bubrege), u 7WG i u 1 CSS. 56 od ukupno 61 bolesnika liječeni su pulsevima glukokortikoida i ciklofosfamidom. Hemodijalizom je liječeno 32,7% bolesnika, a plazmaferezom 23% bolesnika. Za 32 bolesnika (52%) bili su dostupni podaci trajanja bolesti s prosječnim trajanjem bolesti od 9,5 mjeseci (raspona od 3 do 30 mjeseci). U navedenom periodu parcijalna ili kompletna remisija postignuta je u 18 bolesnika (56,3%) bolesnika, 11 bolesnika je bilo u stacionarnoj fazi bolesti, a u 2 bolesnika je došlo do progresije. MPA bio je najčešći (55,7% bolesnika) oblik vaskulitisa malih krvnih žila (153).

Svi bolesnici uključeni u ovaj rad imali su kožne manifestacije VMKfi-a, a patohistološkom pretragom biopsata kože potvrđena im je dijagnoza leukocitoklastičnog vaskulitisa (LCV, sinonim LCA), koji ujedno predstavlja i najčešći i patohistološki nalaz u VMKfi kože (56, 153). Budući da prema literaturnim podacima ne postoji idealan sistem klasifikacije bolesti (4-18), bolesnici s VMKfi su za potrebe ovog istraživanja na temelju patohistološkog nalaza biopsije vaskulitisa promjene na koži bili razvrstani u tri faze bolesti: 1. bolesnici u floridnoj fazi bolesti (F); 2. bolesnici u aktivnoj fazi bolesti (A); 3. bolesnici u regresivnoj fazi bolesti (R). Od 67 bolesnika s VMKfi, u floridnoj fazi bolesti (F), bilo je 16,42% bolesnika, u aktivnoj fazi bolesti (A) 67,16% bolesnika, a u regresivnoj fazi bolesti (R) 16,42% bolesnika. Ovakva raspodjela bolesnika u slučajnom uzorku prema kojoj je najviše ispitanika u trenutku istraživanja bilo u aktivnoj fazi bolesti može se tumačiti činjenicom da oko 60% svih VMKfi predstavlja jednu akutnu samoograničavajuću epizodu koja se obično povlači unutar 6 mjeseci (često povezanu s infekcijom ili lijekom kao okidačem bolesti) (1).

Rezultati analize raspodjele ispitanika prema stupnju bolesti i spolu u ovom radu potvrđuju otkrivanje i podatke iz literature, prema kojoj općenito gledano ne postoji spolna predilekcija za vaskulitis (2). Međutim, neki literaturni podaci ukazuju na veću incidenciju bolesti u žena (19), dok je prema nekima utvrđena je maksimalna incidencija u muškaraca (22). I rezultati epidemiološke studija Gonzalez-Gay i sur. (158), provedene u populaciji sjeverozapadne Španjolske kroz 14 godišnje razdoblje uz primjenu CHCC definicija, osim jasnog porasta

incidencije bolesti s napredovanjem fliivotne dobi, tako er pokazuju ne-to ve u u estalost primarnog sistemskog vaskulitisa u mu-karaca (158).

U ovom istraffivanju, od 11 bolesnika u floridnoj fazi bolesti - F, 6 su bile flene (54,55%), a 5 (45,45%) mu-karci. Od 45 bolesnika u aktivnoj fazi bolesti - A, 23 ispitanice su bile flene (51,11%), a 22 ispitanika mu-karci (48,89%). Me u bolesnicima u fazi regresije - R, bilo je 5 flena (45,45%) i 6 mu-karaca (54,55%) U analiziranom randomiziranom uzorku bolesnika približno je ista u estalost pojave vaskulitisa u osoba flenskog i mu-kog spola u sve tri faze bolesti (F, A i R) -to je u skladu sa onim podacima iz literature koji govore da nema spolne predilekcije za pojavu vaskulitisa (2). Taj rezultat vjerojatno je i posljedica metode slu ajnog izbora bolesnika, prema kojem je u istraffivanom periodu biopsija kofle u približno istim frekvencijama u injena i mu-kim i flenskim osobama s vaskulitisom.

Iako odre eni literaturni podaci (1,2) upu uju na mogu nost pojave VMKfi u svakoj fliivotnoj dobi, pa tako i u dje joj dobi, na temelju rezultata analize ispitanika prema spolu i dobnim razredima ovog istraffivanja te literaturnih podataka, mofle se zaklju iti da je bolest e- a u odrasloj dobi, a rje a u najmla im te najstarijim ispitivanim dobnim skupinama. Analiziraju i skupinu bolesnika u floridnoj fazi (F) i fazi regresije (R) zamije eno je da niti jedan ispitanik nije pripadao dobnom razredu od 11 do 20 godina, niti dobnom razredu od 71 do 80 godina. U skupini bolesnika u aktivnoj fazi bolesti (A) niti jedan ispitanik nije bio u dobi od 81 do 90 godina. Osim toga, zamije eno je da u fazi regresije bolesti (R) niti jedan ispitanik nije pripadao dobnom razredu od 51 do 60 godina, -to bi se moglo tuma iti injenicom da se biopsija kofle naj e- e izvodi u naj e- oj fazi bolesti tj. aktivnoj fazi - A te da je upravo ta dozna skupina me u naj e- e pogo enim dobnim skupinama u aktivnoj bolesti.

Svim ispitanicima u ovom radu analiziran je akrolein u bioptatima kofle te je po prvi puta utvr eno patofiziolo-ko zna enje akroleina u patogenezi VMKfi, bolesti za koji postoje utemeljene pretpostavke da je povezana s oksidacijskim stresom (146,147). Akrolein inducira o-te enje endotelnih stanica te dovodi do poja anog stvaranja ROS-a u ljudskim stanicama mikrovaskularnog endotela (120,127).

U prilog mogu oj povezanosti ACR i oksidacijskog stresa s VMKfi ide patohistolo-ki nalaz, koji u ve ini slu ajeva kofnog oblika VMKfi pokazuje da se radi o neutrofilnom, leukocitoklasti nom vaskulitisu (LCV) (56, 157). Prilikom aktivacije i dijapedeze, neutrofili otpu-taju snafne upalne medijatore, uklju uju i i pripadnike ROS-a, koji dovode do oksidativnog o-te enja unutra-njosti stijenke krvnih flila i tako vjerojatno pridonose razvoju VMKfi (145). Osim toga, jak oksidacijski stres koji se pojavljuje kod upalne reakcije mofle potisnuti obrambene antioksidacijske mehanizme.

S obzirom da je određivanje aktivnosti bolesti složno te da ne postoji jedinstveni biomarker praćenja različitosti i multisistemске prirode vaskulitisa, rezultatima ovog rada se po prvi puta nametnula biološka uloga akroleina u pojavi, procjeni aktivnosti i progresije bolesti. Naime, određivanjem ekspresije akroleina u biopsijama kofe bolesnika s VMKfi utvrđeno je statistički značajno povećanje broja akrolein pozitivnih stanica u usporedbi s kontrolnim uzorcima zdrave kofe. Akrolein je otkrivalo statistički značajno više stanica kofe bolesnika s VMKfi jačeg intenziteta i aktivnosti.

Od ukupno 11 bolesnika u fazi regresije (najblažem, završnom obliku bolesti) u 45,45% je nađen slab intenzitet reakcije (označen 1 bodom), a samo jedan bolesnik iz te skupine je imao jak intenzitet reakcije na akrolein (označen s 3 boda).

Nasuprot tome, od ukupno 45 bolesnika u aktivnoj fazi bolesti niti jedan bolesnik nije imao negativnu reakciju na akrolein, a 71,11% bolesnika te skupine su imala jači intenzitet reakcije (označen s 2 boda).

Od 11 bolesnika u floridnoj fazi (najtežem obliku bolesti), čak 81,82% je imalo jak intenzitet reakcije, obilježen s 3 boda, ostali su imali intenzitet reakcije obilježen s 2 boda, a niti jedan bolesnik nije imao slab intenzitet reakcije (označen s 0 ili 1 bodom).

Bitna svrha novih istraživanja upravo je postavljanje jasnijih i specifičnijih patoloških kriterija pojedinih oblika i faza bolesti te iskazivanje potencijalnih biomarkera prisutnosti sistemske bolesti, i/ili onih biomarkera koji upućuju na veću mogućnost podločnosti prognozi u ozbiljnijem sistemskom obliku bolesti. Identifikacija ACR kao endogenog produkta LPO sugerira ulogu tog reaktivnog aldehida kao medijatora oksidacijskog oštećenja u VMKfi te kao prediktivnog biomarkera u praćenju tijeka bolesti, budući da akrolein može biti otpušten i oslobođen na razna mjesta u cirkulaciji od strane proteinskih karbonilnih adukata (128).

Za bolju procjenu uloge akroleina kao mogućeg patofiziološkog imbenika u oštećenju stanica slobodnim radikalima bilo bi potrebno istraživanje proiritivna i broj bolesnika i dulji vremenski period praćenja, a uputno bi bilo pratiti ekspresiju akroleina u kofe bolesnika nakon određene terapije.

U prospektivni dio rada uključeno je 30 bolesnika s VMKfi. U prospektivnih je bolesnika bilo moguće uzeti i veću broj anamnestičkih podataka. 80% prospektivnih bolesnika s VMKfi je imalo pridruženu kroničnu bolest, a 3,33% je imalo pridruženu zloćudnu bolest (jedan bolesnik imao je patohistološki verificiran hepatocelularni karcinom u sklopu pridružene kronične infekcije *virusom hepatitis C*). Ti rezultati indiciraju da se u oko 93,33% ispitanika ovog rada vjerojatno radi o bolesti kroničnog tijeka, odnosno o VMKfi-u povezanom s

kroni nom ili zlo udnom bole– u (koji predstavlja oko 20% svih VMKfi-a) (1). Zlo udna bolest se na e u oko 1% bolesnika s vaskulitisom, dok je *hepatitis C* est uzrok vaskulitisa, vjerojatno zbog krioglobulinemije (e-medicine). Vaskulitisi povezani s HCV infekcijom (v. Tablica 1, str. 3, imena vaskulitisa prema CHCC2012 nomenklaturi, odlomak - vaskulitisi povezani s mogu om etiologijom i Tablica 2., str. 7, naj e– i okida i vaskulitisa, odlomak - infekcije,) mogu dovesti do zna ajnog morbiditeta i mortaliteta, a antivirusna terapija mo fle sprije iti ili odgoditi pojavu hepatocelularnog karcinoma u bolesnika s kroni nom *HCV* ili *HBV* infekcijom (159,160).

Saadoun i sur. (161) su u svojoj studiji pokazali da i IL-2 mo fle imati pozitivnu ulogu u lije enju bolesnika s vaskulitisom induciranim HCV infekcijom. Naime, ti bolesnici imaju sniflenu razinu T regulacijskih stanica (Treg), a rezolucija HCV infekcije rezultira izlje enjem vaskulitisa i oporavkom Treg. Navedeni autori (161) su u svom radu u obzir uzeli da IL-2, citokin koji podrflava preflivljenje i poti e funkciju Treg, mo fle biti u inkovit lijek u onih bolesnika s vaskulitisom inducuranim HCV infekcijom koja je rezistentna na uobi ajenu antivirusnu terapiju. Tako je u njihovoj studiji lije enju niskim dozama IL-2 podvrgnuto 10 bolesnika koji su prethodno bili rezistentni na konvencionalnu antivirusnu terapiju i terapiju rituksimabom, a nisu primali glukokortikoide niti imunosupresivnu terapiju. Nakon terapije IL-2 zamije ena je redukcija krioglobulinemije u 9 od 10 bolesnika te pobolj–anje vaskulitisa u 8 od 10 bolesnika (161). Transkriptomске studije mononuklearnih stanica u perifernoj krvi pokazale su da IL-2 inducira op u atenuaciju znakova upale i medijatora oksidacijskog stresa (161). U svrhu evaluacije funkcijske aktivnosti granulocita potrebno je dodatno istrafliti i interakciju aktiviranih granulocita s humoralnom imuno– u, a posebnu pozornost potrebno je posvetiti mogu oj sistemskoj citotoksi nosti ROS-a i uklju ivanju potencijalnih antioksidansa u adjuvantnu terapiju (162).

3,33% prospektivnih bolesnika ovog rada je u anamnesti kim podacima iskazalo naviku redovitog konzumiranja alkoholnih pi a, a 23,33% su aktivni pu–a i cigareta. Taj je rezultat u skladu sa slu ajnim uzorkovanjem, a bolest se prema aktualnim literaturnim podacima i ne povezuje s navikom redovitog konzumiranja alkohola i pu–enjem.

Jedan bolesnik (3,33%) od ukupnog broja prospektivnih bolesnika s VMKfi) je u tijeku pra enja bolesti preminuo zbog plu nih komplikacija sistemskog vaskulitisa u jedinici intenzivnog lije enja. Taj je rezultat u skladu s literaturnim podacima prema kojima se fatalni ishod pojavljuje u manjine bolesnika, a procjenjuje se na oko 4% (23).

U tijeku retrospektivne studije Tai YJ i sur. (163) proučena su 93 odrasla bolesnika s LCV u svrhu određivanja klasifikacije, etiologije, ozbiljnosti i prognoze bolesnika. Autori navedene analize su za potrebe te studije razvili novi sistem klasifikacije temeljen na modifikacijama CHCC definicija vaskulitisa i sindroma (17). Tijekom njihove studije preminulo je 6.91% bolesnika, a ekstrakutana zahvaćenost pojedinih organa bila je prisutna u 39.8% bolesnika (163).

Prema literaturnim podacima uestalost sistemskih simptoma tj. zahvaćanja pojedinih organa me u bolesnicima s VMKfi je različita kod različitih tipova VMKfi (50). Najčešći i pridruženi sistemski simptom u prospektivnih bolesnika s VMKfi u ovom radu bila je povišena tjelesna temperatura (u 50% prospektivnih ispitanika). Na drugom mjestu po učestalosti simptoma sistemskog vaskulitisa u prospektivnih bolesnika su artralgijske (36,67%) i otok zglobova (36,67%). Navedeni su rezultati u skladu s literaturnim podacima, prema kojima prodromalni simptomi (vrućica, artralgijske i opće loše osjećaje) često prate kofne vaskulitisa i sindrome malih krvnih žila (1,50). Osim toga, povišena tjelesna temperatura kao najzastupljeniji opći simptom u ovom radu, je i rizični simptomatski pokazatelj za sistemsku bolest (25), a 93,33% prospektivnih bolesnika s VMKfi u me u ispitanicima ovog rada je imalo znakove sistemskog vaskulitisa.

30% prospektivnih bolesnika anamnestički je iskazivalo simptome kašlja i prisutnosti krvi u mokraći, a 23,33% prospektivnih bolesnika simptom glavobolje. Prema nekim literaturnim podacima sistemski zahvaćenost je mnogo češća osobito u bolesnika s vrlo teškim kliničkim slikama KLCA, a prema istraživanju Ioannidou DJ i sur. (52) u 43% bolesnika koji se prezentiraju KLCA utvrđena je zahvaćenost bubrega. Među rjeđim sistemskim simptomima u prospektivnih bolesnika su zabilježene mijalgije (16,67% bolesnika), bolovi u trbuhu (10% bolesnika), proljev (10% bolesnika), prisutnost krvi u stolici (6,67% bolesnika), prisutnost krvi u iskašljaju (6,67% bolesnika) i parestezije (6,67% bolesnika).

Rezultati analize biokemijskih i upalnih parametara u ovom radu upućuju na proučavanje slijedećih parametara kao mogućih biomarkera u evaluaciji oksidacijskog statusa bolesnika te aktivnosti i proinflammatornosti bolesti: CRP, Leu, Neu, Fe, feritin, urea i kreatinin.

CRP je protein akutne faze upale, koji ima ulogu u promociji lokalnog proinflammatornog učinka. Zbog toga, povišena vrijednost CRP može utjecati na tijek bolesti indukcijom lokalne aktivacije komplementa i posljedičnim pojačanjem lokalne upale i staninog oštećenja (164,165). Uočene statistički značajno povišene vrijednosti ovog upalnog parametra u serumu bolesnika s VMKfi u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika govore u prilog ovom

parametru kao biomarkeru intenziteta upalne reakcije i oksidacijskog o-te enja. Osim toga, vrijednosti CRP su se statisti ki zna ajno razlikovale ovisno o fazi bolesti kojoj je pripadao pojedini bolesnik s VMKfi u trenutku procjene. Najvi-e vrijednosti CRP zabiljeffene su u skupini bolesnika u aktivnoj fazi bolesti, ime se indicira i njegova uloga kao potencijalnog sistemskog biomarkera procjene aktivnosti bolesti.

Svi prospektivni bolesnici s VMKfi imali su izraffenu leukocitozu i neutrofiliju u krvnoj slici. Taj rezultat je komplementaran i histolo-kom nalazu neutrofilnog, leukocitoklasti nog vaskulitisa u biopstatima kofle prospektivnih bolesnika s VMKfi. Vrijednosti leukocita i neutrofila u krvnoj slici su ovisile o stupnju aktivnosti bolesti. Najvi-e vrijednosti ovih parametara pokazivali su bolesnici s VMKfi u floridnoj fazi bolesti. Naime, citokinima posredovane proinflammatorne promjene i aktivacija leukocita smatraju se klju nim imbenicma upale i o-te enja krvnih flila u ovoj bolesti, budu i da prilikom aktivacije i dijapedeze neutrofili otpu-taju snafne upalne medijatore, uklju uju i i ROS (145). Na taj na in vjerojatno pridonose razvoju ove bolesti. Zamije ena infiltracija neutrofilima na lokalnoj razini (leukocitoklazija u histolo-kom nalazu bolesnika s VMKfi) te leukocitoza i neutrofilija u krvnoj slici bolesnika s VMKfi, sugerira ove parametre kao potencijalne biomarkere evaluacije intenziteta upalne reakcije i oksidacijskog stresa.

Statisti ki zna ajno povi-ene vrijednosti serumskog feritina i sniffene vrijednosti serumskog fljeljeza u prospektivnih bolesnika s VMKfi (n=30) u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (n=30) upu uju na poreme en metabolizam fljeljeza, i posljedi no tome povi-en oksidacijski stres u bolesnika s VMKfi. Feritin je protein koji moffe brzo skladi-titi ali i otpu-tati fljeljezo, te ima dvojaku ulogu ó -tetnu ako je izvor fljeljeza ili korisnu ako veffe fljeljezo kada ima ulogu u inkovitog antioksidansa (166). Povi-ena vrijednost feritina u serumu obja-njava pogor-anje aktivnosti bolesti, jer se iz feritina osloba a slobodno fljeljezo, koje zbog svojih oksidoredukcijskih svojstava predstavlja opasnost. Naime, slobodno fljeljezo katalizira pretvorbu superoksidnog aniona (O_2^-) i vodikovog peroksida (H_2O_2) u iznimno reaktivne hidroksilne radikale ($\cdot OH$), koji imaju dovoljnu energiju da izazove LPO (107,108). S obzirom na poznatu ulogu fljeljeza, kao bitnog katalizatora LPO, naro ito u slu ajevima prekomjerne produkcije superoksidnih aniona koje stvaraju neutrofili za vrijeme trajanja upalnih reakcija (kao -to je u slu aju bolesnika s VMKfi) ili u uvjetima preoptere enja molekula koje skladi-te fljeljezo, name e se pitanje o ulozi fljeljeza kao katalizatora oksidacijskog stresa u bolesnika s VMKfi. U normalnim uvjetima, pri neutralnom pH, feritin vrsto veffe fljeljezo. U uvjetima preoptere enja molekula feritina fljeljom ili sniffenja pH za vrijeme upalne reakcije, feritin moffe lako otpu-tati fljeljezo. U upalnoj reakciji u VMKfi,

superoksidni anion kojeg stvaraju neutrofili, tako er mođe doprinijeti mobilizaciji željeza (167). I tome u prilog govori nalaz leukocitoze i neutrofilije u prospektivnih bolesnika te histološki nalaz leukocitoklasti nog vaskulitisa u biopstatima koje prospektivnih bolesnika VMKfi. Ovi rezultati sugeriraju da povišene zalihe uskladištenog željeza, izmjerene kao serumska koncentracija feritina, mogu biti povezane s oksidacijskim stresom i povišenim rizikom za progresiju aktivnosti VMKfi.

Zanimljiv je rezultat da su prospektivni bolesnici s VMKfi imali statisti ki zna ajno povišene vrijednosti i feritina, ali i serumskog željeza u floridnoj fazi bolesti u odnosu na bolesnike u aktivnoj fazi i fazi regresije. Uloga feritina u oštećenju stanica oksidacijskim stresom još uvijek nije dovoljno jasna (166). Naime, u stanju oksidacijskog stresa feritin u stanici mođe biti oksidans, ali i antioksidans, što ovisi o duljini trajanja oksidacijskog stresa, imbenicima koji su ga prouzročili, kao i o vrsti feritina. Degradacija feritina u ranoj fazi izlaganja stanice vanjskim uzročnicima oksidacijskog stresa dovodi do oslobađanja slobodnog željeza, kada feritin smatramo prooksidansom, jer potiče oksidacijski stres. Sukladno tome, mođe se pretpostaviti da je oksidacijski stres najizraženiji u bolesnika u najintenzivnijoj floridnoj fazi bolesti, čemu u prilog ide i rezultat da su vrijednosti serumskog Fe u prospektivnih ispitanika s VMKfi bile povišene jedino u toj fazi bolesti. Nasuprot tome, u kasnijoj fazi, uključuju se brojni kompenzatorni molekularni mehanizmi, koji pospješuju obnovu sadržaja feritina koji veće slobodno željezo i na taj se način onemogućava njegova prooksidacijska uloga (166). Upravo je duljina trajanja oksidacijskog stresa moguće objašnjenje za statisti ki zna ajno povišene vrijednosti serumskog željeza u bolesnika s VMKfi u floridnoj fazi bolesti u odnosu na bolesnike s VMKfi u aktivnoj fazi i fazi regresije.

Ovi su rezultati su u skladu i sa rezultatima imunohistokemijske analize ekspresije ACR prema fazi aktivnosti bolesti. ACR, analizirani parametar povišenog oksidacijskog stresa na lokalnoj razini, štovalo je statisti ki zna ajno višestruko stanica koje bolesnika s VMKfi jaeg intenziteta i aktivnosti bolesti. Naime, čak 81,82% bolesnika s VMKfi u floridnoj fazi bolesti je imalo jaki intenzitet reakcije ekspresije ACR (3 boda), a niti jedan prospektivni bolesnik s VMKfi u floridnoj fazi nije imao slabi intenzitet reakcije (označen s 0 ili 1 bodom).

U svih prospektivnih bolesnika s VMKfi utvrđene su statisti ki zna ajno povišene vrijednosti ureje i kreatinina u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Taj je rezultat u skladu s literaturnim podacima (43) koji potvrđuju da su u sistemskim oblicima bolesti među najčešće zahvaćenim organima upravo bubrezi. Između oba navedena biokemijska parametra procjene bubregne funkcije utvrđena je pozitivna korelacija u svih prospektivnih bolesnika s VMKfi. Stoga i rezultati ovog rada potvrđuju da je sve bolesnike s KLCA potrebno dijagnosti ki

obraditi u smislu eventualne zahvaćenosti bubrega. Upravo su dijagnostički postupci rane detekcije i pravodobno liječenje poremećaja bubregne funkcije od iznimne važnosti u pristupu bolesniku s VMKfi. Važno je napomenuti da nepravodobno prepoznata i neliječena renalna insuficijencija može predstavljati vrlo ozbiljnu komplikaciju ove bolesti.

Navedeni rezultati analize serumskih upalnih i biokemijskih parametara običeni su na manjem broju bolesnika s VMKfi (n=30). Stoga su neophodna daljnja istraživanja koja bi obuhvatila već i broj bolesnika s VMKfi i zdravih osoba (kontrola) kroz dulji vremenski period, a uputno bi bilo pratiti iste parametre i nakon određene terapije, kako bi se pouzdanije razjasnila uloga oksidacijskog stresa i poremećaja eno metabolizma željeza u patogenezi ove bolesti.

Nadalje, na temelju ovih rezultata otvoren je i put istraživanju imunohistokemijske ekspresije feritina u biopsijama kože bolesnika s VMKfi, kao mogućeg parametra poremećaja eno metabolizma željeza i oksidacijskog stresa na lokalnoj razini i prediktivnog čimbenika progresije VMKfi kože u sistemski oblik bolesti.

U svrhu dokazivanja povišene razine oksidacijskog stresa i razjavanja njegove biološke uloge u pojavi, procjeni aktivnosti i progresije VMKfi, u serumu prospektivnih bolesnika je određena koncentracija peroksida. Bolesnici s VMKfi imali su povišene vrijednosti koncentracije peroksida u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

Za procjenu mehanizama zaštite stanice i organizma od prekomjernog i štetnog djelovanja oksidacijskog stresa u serumu bolesnika s VMKfi i u zdravih ispitanika određena je ukupni antioksidacijski kapacitet. U serumu bolesnika s VMKfi nađena je statistički značajno niži ukupni antioksidacijski kapacitet (izražen kao ekvivalent koncentracije (mg/mL) mokraćne kiseline), u odnosu na vrijednosti nađene u serumu zdravih (kontrolnih) ispitanika. Mokraćna kiselina je nusprodukt metabolizma koja cirkuliraju u plazmi i « istiti » superoksidni i hidroksilni radikal, peroksi i alkoksi radikale te singletni kisik te zbog tog svojstva predstavlja važan neenzimatski mehanizam obrane organizma od štetnog djelovanja ROS-a (168).

Rezultati pokusa analize koncentracije peroksida i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u serumu i zamijetne razlike između bolesnika i zdravih ispitanika, potvrđuju utemeljenu pretpostavku o ulozi oksidacijskog stresa i smanjenoj funkciji obrambenog antioksidacijskog kapaciteta u bolesnika s VMKfi (146,147,169,170,171).

I rezultati analize TOC i TAC dobiveni su na manjem broju bolesnika s VMKfi (n=30) i zdravih ispitanika iz kontrolne skupine (n=30). Stoga su rezultati ovog rada solidna podloga daljnjim istraživanjima koja bi obuhvatila već i broj ispitanika u analizi TOC i TAC, kako bi se pouzdanije razjasnila uloga oksidacijskog stresa u patogenezi ove bolesti.

Unato činjenici da je koža kao najveći i vrlo dobro vaskulariziran ljudski organ esto zahvaćena različitim oblicima sindroma vaskulitisa, uloga oksidacijskog stresa u patogenezi VMKfi kože je proučavana samo u nekim oblicima bolesti (146,147,148,169,170).

Behçetova bolest, prema CHCC2012 nomenklaturi pripada u skupinu vaskulitisa krvnih žila promjenjive težine (18) (v. Tablicu 1, str. 3, imena vaskulitisa prema CHCC2012 nomenklaturi, odlomak o VKfiPV). Radi se o kroničnom multisistemskom vaskulitisu, nedovoljno poznate patogeneze. Özyazgan S. i sur. (148) su dokazali ulogu upalom potaknutog oksidacijskog stresa u Behçetovoj bolesti, karakteriziranom endotelnom disfunkcijom, povišenom razinom ROS-a i povišenom produkcijom i hiperfunkcijom neutrofila. U literaturi raste broj studija koje potvrđuju ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi Behçetove bolesti (148,172-180).

Endotelne stanice produciraju endogeni dušikov oksid, a snižene razine dušikovog oksida posredovane povišenim oksidacijskim stresom koreliraju sa endotelnom disfunkcijom zamijećenoj u Behçetovoj bolesti (181,182). Rezultat endotelne disfunkcije je vaskulitis, jedan od prominentnih znakova Behçetove bolesti (182). Acikgoz i sur. (183) su istraživali povezanost između u markera oksidacijskog stresa i funkcije endotela u bolesnika s Behçetovom bolešću. Razine serumskog GGTA i visoko osjetljivog CRP-a bile su povišene u svih bolesnika u odnosu na ispitanike kontrolne skupine, a razine navedenih parametara su u inverznom odnosu sa funkcijom endotela (183). I rezultati ovog rada potvrđuju prethodno navedene literaturne podatke (183), budući da su svi prospektivni bolesnici s VMKfi imali statistički značajno povišene vrijednosti serumskog GGT i CRP (tablica 15) u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, što govori u prilog posljednjem proporcionalnom odnosu razina vrijednosti ovih parametara s endotelnom disfunkcijom u bolesnika s VMKfi. Time se nameće njihova uloga kao potencijalnih biomarkera oksidacijskog stresa i disfunkcije endotela u bolesnika s VMKfi.

Najvažniji korak koji sudjeluje u aktivaciji neutrofila i produkciji ROS-a koji uzrokuju tkivno oštećenje je povišenje koncentracije slobodnog kalcija u citosolu. Korkmaz i sur. (169) su istraživali u inak kolhicina na oksidacijski stres i otpuštanje Ca^{2+} u serumu i neutrofile u aktivnim i inaktivnim periodima Behçetove bolesti. Sedimentacija eritrocita, broj leukocita, CRP, neutrofil, serumski lipidni peroksidacija i otpuštanje intracelularnog Ca^{2+} bili su povišeni u bolesnika u aktivnoj i inaktivnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu, a razine navedenih parametara bile su višje u bolesnika s aktivnom fazom u odnosu na inaktivnu fazu bolesti. Koncentracija serumskog glutationa, vitamina A, vitamina E i beta karotena bile su snižene i u aktivnoj i inaktivnoj fazi bolesti, iako su koncentracije serumskog vitamina E i

beta karotena bile vi-e u inaktivnoj grupi u odnosu na grupu bolesnika u aktivnoj fazi. Ovom studijom je zamije ena vafnost Ca^{2+} influksa u neutrofile i oksidacijskog stresa u aktivaciji i patogenezi ovog tipa vaskulitisa, a pokazano je da kolhicin ima protektivni u inak na oksidacijski stres modulacijom influksa Ca^{2+} u neutrofile bolesnika (169).

S obzirom na dokazanu ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi bolesti, kao mogu i parametri u evaluaciji oksidacijsko /antioksidacijskog statusa i aktivnosti Behçetove bolesti u literaturi se indicira pra enje razina 8-hidroksi-deogvanozin, aktivnost eritrocitne du-ik-oxid sintetaze, SE, CRP, razina homocisteina, serumske razine alantoina, ali i antioksidacijskih obrambenih mehanizama (razine vitamina E, C, B1, B2 i flavin mononukleotida) (184-188).

Studijom Evereklioglu i sur. (189) pokazano je da su povi-ene razine sil-2R (solubilnog IL-2 receptora), IL-6, IL-8 i TNF- povezane s aktivno- u bolesti, a povi-ena lipidna peroksidacija sugerira oksidacijski stres i o-te enje tkiva u bolesnika s Behçetovom bole- u. Pobj- anje klini kih manifestacija moglo bi se posti i farmakolo- kim agensima kojima su cilj djelovanja upravo ti citokini, kemokini i produkti lipidne peroksidacije (189). Studija Harzallha i sur. (190) potvr uje da aktivnost antioksidacijskih enzima, osobito SOD, negativno korelira s trajanjem i aktivno- u Behçetove bolesti. Stoga autori studije smatraju da racionalno ja anje antioksidacijskih obrambenih mehanizama treba biti dio optimalne terapijske strategije (190). I rezultati studije Sepici-Dincel i sur. (191) pokazuju poreme aj u smislu insuficijentnog antioksidacijskog sustava i povi-enog oksidacijskog stresa u bolesnika s Behçetovom bole- u. Time se name e otvoren put antioksidacijskim suplementima kao adjuvantnoj terapiji u pobolj-avanju kvalitete flivota ovih bolesnika (191). Rezultati studije Gulbahara i sur. (192) indiciraju potencijalni u inak kolhicina i vitamina E u terapiji pove ane oksidacije proteina i peroksidacije lipida, a Chambers i sur. (193) su svojom studijom dokazali da se naru-ena endotelna funkcija u Behçetovoj bolesti mođe pobolj-ati i tretmanom vitaminom C.

Povi-en oksidacijski stres ima ulogu i u patogenezi HSP vaskulitisa (147,194). Budu i da kroni ni dugotrajni oblici vaskulitisa predstavljaju i sekundarni rizi ni imbenik za nastanak ateroskleroze, name e se potreba istraffivanja i antioksidacijskih terapijskih opcija (194). Studijom Buyan i sur. (195) dokazane su zna ajno povi-ene razine MDA u plazmi te zna ajno sniflene razine vitamina E u aktivnoj fazi HSP, -to indicira ulogu oksidacijskog stresa u HSP. Me utim, u studiji Erdogana i sur. (196) dokazano je da bolesnici s HSP koji su dobivali vitamin E nisu pokazivali znakove pobolj-anja u smislu normalizacije parametara oksidacijskog o-te enja, niti klini kog tijekom bolesti, unato zna ajnom povi-enju razine vitamina E u plazmi. Zaklju ili su da iako oksidacijsko o-te enje i lipidna peroksidacija imaju vafnu ulogu u patogenezi HSP, davanje vitamina E nakon ve zapo etog procesa LPO, kao

završne faze stani nog oštećenja, nema koristi u prekidanju lanane reakcije koja je već potaknuta (196).

U radu Ko-Jen Li i sur. (170) dokazano je povećano urinarno izlučivanje N-benzoil-glicil-N⁶- (heksanonil) lizina, biomarkera oksidacijskog stresa, u 26 bolesnika s aktivnim SLE u usporedbi s 11 bolesnika s nekom drugom sistemskom bolešću u vezivnog tkiva i 14 zdravih kontrolnih ispitanika. Lupus vaskulitis prema CHCC2012 nomenklaturi pripada u skupinu vaskulitisa povezanih sa sistemskom bolešću (18) (v. tablicu 1, str. 3, imena vaskulitisa prema CHCC2012 nomenklaturi, odlomak - vaskulitisi povezani sa sistemskom bolešću). U svom radu su pokazali da limfociti T i polimorfonuklearni leukociti u aktivnom SLE u usporedbi s normalnim stanicama pokazuju defektnu ekspresiju i reguliraju ih prijenosnika glukoze GLUT-3 i GLUT-6, što dovodi do povećanja intracelularnih bazalnih laktata i snižene produkcije ATP-a (161). U T limfocitima bolesnika s aktivnim SLE bila je povećana intracelularna razina GSH, aktivnost enzima glutation peroksidaze i gama glutamil transpeptidaze (GGT). Polimorfonukleari u bolesnika s aktivnim SLE pokazali su snižene intracelularne razine GSH i aktivnosti enzima GGT te pojačanu ekspresiju CD 53, koprecipitirajuće molekule GGT. Zaključili su da su poremećaji i defekt redoks kapaciteta u T limfocitima i polimorfonuklearima odgovorni za staninu imunodisfunkciju i povećan oksidacijski stres u bolesnika s aktivnim SLE (170). Oksidacijski stres je relevantan imbenik u patogenezi autoimunih bolesti sa zahvaćanjem krvnih žila, kao što je SLE. Sukladno tom patogenetskom imbeniku, pretpostavka je da bi se i poboljšanje kliničkih manifestacija tih bolesti moglo postići i dijetnim i farmakološkim antioksidansima, kojima je glavni cilj djelovanja lipidna peroksidacija (197). Antimijeloperoksidazna antitijela mogu imati ulogu u patogenezi bolesnika s mikroskopskim poliangitisom, tako što potiču oksidacijski prasak, koji dovodi do ozbiljnog oštećenja endotela (198). U studiji Guilpaina i sur. (198) pokazano je da tretman ovih bolesnika N⁶ acetylcysteinom, antioksidacijskom molekulom, može ublažiti aktivaciju MPO u generiranju oksidacijskog stresa i na taj način smanjiti endotelno oštećenje. U studiji Serbana i sur. (199) proučavan je u inak vitamina E pridruženog kortikosteroidnoj terapiji u liječenju sistemskih vaskulitisa. Tom je studijom zaključeno da takva kombinirana terapija ima relativno reduciran učinak zbog složenog metaboličkog poremećaja i kontinuiranog tijeka autoimunog patogenog procesa (199).

Među najčešće okidače KLCA spadaju lijekovi (v. tablicu 1, str. 3, imena vaskulitisa prema CHCC2012 nomenklaturi, odlomak - vaskulitis povezan s mogućom etiologijom i tablicu 2, str. 7, najčešće okidači i VMKfi), koji uzrokuju otprilike oko 10% vaskulitisa njih lezija kože

(18,23,50), a u 29 opisanih kliničkih manifestacija reakcija na lijekove spada i leukocitoklastični vaskulitis (1,2,3). Kofne reakcije na lijekove mogu biti imunološke i neimunološke uvjetovane, a to ni mehanizmi su vrlo nejasni. Smatra se da i drugi mehanizmi mogu pojačati reakciju na lijek te utjecati na ozbiljnost i trajanje reakcije, a jedan takav mogu i mehanizam je i oksidacijski stres. Cilj studije Verma i sur. (171) bio je određivanje statusa oksidacijskog stresa u krvi bolesnika s kožnim manifestacijama na lijekove, među kojima je bio i bolesnik s vaskulitisom. U svrhu procjene oksidacijskog stresa kao mogućeg mehanizma u imunopatogenezi kožnih reakcija na lijekove, provedena je analiza reduciranog glutationa (GSH) kao mjere antioksidacijskog kapaciteta, analiza razine malondialdehida (MDA) kao mjere oksidacijskog lipidnog oštećenja te određivanje inhibicije migracije leukocita u odgovoru na suspektan lijek. Temeljem navedenih analiza utvrđeno je povećan oksidacijski stres u krvi bolesnika s kožnim manifestacijama na lijekove. Osim toga, utvrđeno je i značajno pozitivna korelacija odgovora inhibicije migracije leukocita na uzročni lijek s razinama MDA, što vrsto povezuje oksidacijski stres i imunopatogenezu kožnih manifestacija na lijekove (171).

Za očekivati je da će se razjašnjenjem etiopatogeneze bolesti u budućnosti, utvrditi i to anapatoogenetski odnos između ROS-a koje stvaraju neutrofili i upalnog procesa u bolesnika s VMKf. Time će se pridonijeti postizanju potencijalnih specifičnih ciljeva liječenja (šćiljna terapija), a među terapijskim ciljevima u literaturi se navode i ROS (23).

Liječenje VMKf predstavlja terapijski izazov, budući da su u bolesnika sa sistemskim vaskulitisom česti relapsi i pogoršanja. Danas se u liječenju sve češće koriste biološki lijekovi kao nova terapijska mogućnost. Najčešće korišten biološki lijek je rituximab, koji se pokazao najučinkovitijim agensom u indukciji remisije ANCA povezanih vaskulitisa (vidi tablicu 1, str. 3, imena vaskulitisa prema CHCC2012 nomenklaturi, odlomak - VMKf). Navedeni lijek nije ništa manje učinkovit u odnosu na ciklofosamid u indukciji remisije. Infliximab i adalimumab su vrlo učinkoviti škortikosteroidni lijekovi, a provode se i studije upotrebom abatacepta, alemtuzumaba, mepolizumaba i tokolizumaba (200).

To ni molekularni mehanizmi inducirano oksidacijskog stresa u endotelnim stanicama još su uvijek dobrim dijelom nepoznati. Potencijalni molekularni mehanizmi endotelnih oštećenja istraživani su na modelima vaskulitisa i vaskularnih oštećenja uzrokovanih primjenom antikancerogenih lijekova u kemoterapiji zloćudnih bolesti (201,202).

Vinorelbin tartarat (VNR) je semisintetski alkaloid, derivat vinblastina, široko je korišten antikancerogeni lijek. Međutim VNR-om inducirano oksidacijsko oštećenje dovodi i do nekih nepoželjnih učinaka kao što su venska iritacija, vaskularna bol i nekrotizirajuć i vaskulitis.

Upravo ti nefeljeni u inci ograni avaju njegovu klini ku primjenu te posljedi no potiskuje klini ku u inkovitost u lije enju zlo udnih bolesti. U studiji Tsai KL i sur. (201) pretpostavljeno je da VNR inducira oksidacijsko o-te enje modulacijom AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK). Ljudske endotelne stanice umbilikalne vene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* ó HUVECs) tretirane su VNR-om do postizanja oksidacijskog o-te enja. VNR-om posredovana ekspresija AMPK, PKC i NADPH oksidaze analizirane su Western blott metodom. Tretman VNR-om rezultirao je defosforilacijom AMPK, -to je dovelo do aktivacije NADPH oksidaze, a taj je u inak potisnut antagonistom AMPK. U studiji je tako er pokazano da VNR poja ava nekoliko proinflatornih doga aja, kao -to su adherencija monocita THP-1 stanica za HUVECs, -to dovodi do otpu-tanja proinflatornih citokina i prekomjerne ekspresije adhezijskih molekula (201).

Epirubicin je antraciklinski antikancerogeni lijek, koji kao i VNR esto uzrokuje vaskularnu bol, upalu vene i nekrotiziraju i vaskulitis. U inkovita prevencija epirubicinom induciranog vaskularnog o-te enja jo-nije postignuta. Namjera Yamade i sur. (202) u njihovoj studiji bila je identificirati mehanizme ozljeda stanica induciranih epirubicinom u endotelnim stanicama porcine aorte (PAECs). U studiji je pokazano da epirubicin povisuje aktivnost kaspaze -3/7, apoptoti nih stanica i razine intracelularnih lipidnih peroksida, a tako er inducira i depolarizaciju mitohondrijskih membrana. Epirubicinom inducirano o-te enje stanica i pove anje aktivnosti kaspaze -3/7 je poja ano inhibitorima p38 mitogen-aktivirane protein kinaze (MAPK) (202).

U prilog povezanosti endotelnog o-te enja i endotelne disfunkcije uslijed pove anog oksidacijskog stresa idu i rezultati studija provedenih na animalnim modelima (203-208).

Baliga i sur. (203) su u svojoj studiji po prvi puta pokazali specifi nu funkcionalnu vaskulopatiju sa zahva anjem endotela na mi-jem modelu AIDS-a koji je bio povezan i korelirao sa povi-enim oksidacijskim stresom i specifi nom endotelnom aktivacijom. Gatica i sur. (204) su istraffivali u inak deficijencije vitamina A na ultrastrukturu aorte u -takora te su dokazali da deficit vitamina A inducira aktivaciju NF- B i naru-ava aktivnost antioksidacijskih enzima u aorti. Nrf2 je transkripcijski faktor kojeg aktiviraju ROS u krvnim filama mladih flivotinja, -to dovodi do prilagodbe u smislu pomaka ravnoteffe prema aktivaciji antioksidacijskih gena (118,205). U studiji Ungvari i sur. (205) dokazana je povezanost starenja i disfunkcije transkripcijskog imbenika Nrf2 u arterijama primata *Macaca mulatta*, -to dovodi do egzacerbacije oksidacijskog stresa povezanog sa starenjem, promocije aktivacije NF- B i upale krvnih flila u starenju.

Wu i sur. (206) proveli su studiju o djelovanju merkuri-klorida u indukciji autoimunosti na animalnom modelu *Brown Norway* –takora. Zaklju ili su da merkuri-klorid vjerojatno inducira oksidacijski stres aktivacijom NFó B, transkripcijskog imbenika za IL-4 gen. Pokazali su i da tretman antioksidansima N-acetilcisteinom i desferiokasaminom dovodi do supresije rane faze vaskulitisa na animalnom modelu (207).

Quercetin je antioksidacijski flavonoid koji ima jaku protuupalnu i citoprotektivnu aktivnost. U studiji Kukongviriyapan i sur. (208) istraflivan je i dokazan preventivni i terapijski u inak quercetina u lipopolisaharidima induciranom oksidacijskom o-te enju i vaskularnoj disfunkciji u mi-a.

Upravo takvi modeli istraflivanja (animalni modeli endotelnih o-te enja i modeli vaskulitisa uzrokovani primjenom antikancerogenih lijekova u kemoterapiji) predstavljaju i potencijalne modele za istraflivanje uloge i u inka potencijalnih antioksidacijskih lijekova u lije enju VMKfi-a, kao nove terapijske mogu nosti.

Me utim, provo enje kontroliranih klini kih studija je jedina objektivna mjera koja mođe dati jasan odgovor da li je korisno uzimati neki antioksidans u farmakolo–koj koli ini za odre ene bolesti, za koje postoji utemeljena pretpostavka da su povezane sa oksidacijskim stresom. U tom smislu treba biti razuman i dovoljno kriti an u prihva anju novih lijekova sa antioksidativnim u inkom u terapiji.

Nedvojbeno je da je ovim radom po prvi puta dokazano zna enje akroleina i potvr ena uloga oksidacijskog stresa u bolesnika s VMKfi. Jednako tako, rad je pokazao da bi trebalo dalje istraflivati ulogu lijekova s antioksidacijskim u inkom i istrafliti bi li ti lijekovi mogli imati ulogu u smanjenju progresije bolesti.

S obzirom na injenice da je kofla esto zahva ena razli itim oblicima VMKfi, da je etiologija mnogih oblika VMKfi nepoznata, a trenutni terapijski pristupi relativno nespecifi ni, ovaj je rad vrijedan doprinos u razumijevanju mehanizama pogor–anja bolesti i solidna podloga za daljnja istraflivanja etiopatogenetskih imbenika, prognosti kih biomarkera i terapijskih pristupa za ovu bolest.

6. ZAKLJUČCI

1. U ovom radu je po prvi puta utvrđena uloga ACR u patogenezi VMKfi i potvrđena utemeljena pretpostavka da je bolest povezana s oksidacijskim stresom.
2. U prilog povezanosti ACR i oksidacijskog stresa s VMKfi ide patohistološki nalaz bioptata kofe bolesnika s VMKfi, koji u većine bolesnika pokazuje da se radi o neutrofilnom (leukocitoklastičnom) vaskulitisu.
3. Uočena infiltracija neutrofilima na lokalnoj razini (leukocitoklazija u histološkom nalazu) te leukocitoza i neutrofilija na sistemskoj razini u bolesnika s VMKfi, sugerira ove parametre kao potencijalne biomarkere evaluacije intenziteta upalne reakcije i oksidacijskog stresa, budući da se prilikom aktivacije neutrofila otpuštaju snažni upalni medijatori, uključujući i ROS.
4. Imunohistokemijskim određivanjem ACR u bioptatima kofe bolesnika s VMKfi utvrđeno je statistički značajno veći intenzitet ekspresije ACR u usporedbi s kontrolnim uzorcima zdrave kofe.
5. Intenzitet imunohistokemijske reakcije ekspresije ACR ovisio je o fazi i aktivnosti bolesti. Statistički značajno veći intenzitet ekspresije ACR utvrđen je u bioptatima kofe bolesnika floridne faze (s tešim oblicima oštećenja MKfi) i jačeg intenziteta bolesti.
6. Budući da ACR može biti otpušten i oslobođen na razna mjesta u cirkulaciji od strane proteinskih karbonilnih adukata, identifikacija ACR kao endogenog produkta LPO, sugerira ulogu tog reaktivnog aldehida kao medijatora oksidacijskog oštećenja te kao prediktivnog biomarkera u praprijeku prijelaza lokaliziranog u prognostički ozbiljniji sistemski oblik VMKfi.
7. Rezultati analize biokemijskih i upalnih parametara u ovom radu upućuju na CRP, leukocite, neutrofile, feritin i Fe, kao potencijalne biomarkere intenziteta upalne reakcije, oksidacijskog stresa i procjene aktivnosti bolesti.
8. Povišena vrijednost feritina u serumu bolesnika s VMKfi uznapredovalije faze i jačeg intenziteta bolesti objašnjava pogoršanje aktivnosti bolesti, jer se iz feritina oslobađa slobodno željezo, koje ima ulogu bitnog katalizatora LPO.
9. Bolesnici s VMKfi imali su povišene vrijednosti ukupnog oksidacijskog kapaciteta u serumu (TOC), pokazatelja sistemskog oksidacijskog stresa, u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

10. U serumu bolesnika s VMKfi utvrđen je statistički značajno niži ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u odnosu na vrijednosti nađene u serumu zdravih ispitanika, što ukazuje na smanjen kapacitet obrambenih antioksidacijskih mehanizama u bolesnika s VMKfi.

11. Navedeni rezultati analize serumskih upalnih i biokemijskih parametara te parametara oksidacijskog stresa (TOC i TAC) dobiveni su na manjem broju prospektivnih bolesnika s VMKfi te upućuju na daljnja istraživanja na većem broju ispitanika kroz dulji vremenski period, kako bi se pouzdanije razjasnila uloga oksidacijskog stresa u bolesnika s VMKfi.

12. Rezultati ovog rada također upućuju i na potrebu daljnjih istraživanja patogenetskih mehanizama, prognostičkih biomarkera praćenja aktivnosti i pro-irenosti bolesti te mogućnosti i koristi primjene lijekova s antioksidacijskim svojstvima u bolesnika s VMKfi.

7. LITERATURA

1. Carlson JA. The histological assessment of cutaneous vasculitis. *Histopathology* 2010;56:3-23.
2. Braun Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W.H.C. Diseases of the Blood Vessels. In: Braun Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf W.H.C. *Dermatology*. Second completely revised edition. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 2000. p.895-919.
3. Budim i D. Bolesti krvnih i limfnih flila. U: Dobri I. i sur. *Dermatovenerologija*. 3. Promijenjeno i dopunjeno izdanje, Grafoplast; 2005. p.239-243.
4. Zeek PM. Periarteritis nodosa; a critical review. *Am J Clin Pathol* 1952;22:777-790.
5. Fries JF, Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Summary. *Arthritis Rheum* 1990;33:1135-1136.
6. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1101-1107.
7. Masi AT, Hunder GG, Lie JT, Michel BA, Bloch DA, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis). *Arthritis Rheum* 1990;33:1094-1100.
8. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122-1128.
9. Mills JA, Michel BA, Bloch DA, Calabrese LH, Hunder GG, Arend WP, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schönlein purpura. *Arthritis Rheum* 1990;33:1114-1121.
10. Calabrese LH, Michel BA, Bloch DA, Arend WP, Edworthy SM, Fauci AS, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of hypersensitivity vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1108-1113.

11. Lightfoot RW Jr, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Zvaifler NJ, McShane DJ, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum* 1990;33:1088-1093.
12. Arend WP, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Calabrese LH, Edworthy SM, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1129-1134.
13. Callen JP. Cutaneous vasculitis: what have we learned in the past 20 years? *Arch Dermatol* 1998;134:355-7.
14. Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, McShane DJ, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Patients and methods. *Arthritis Rheum* 1990;33:1068-1073.
15. Bloch DA, Moses LE, Michel BA. Statistical approaches to classification. Methods for developing classification and other criteria rules. *Arthritis Rheum* 1990;33:1137-44.
16. Rao JK, Allen NB, Pincus T. Limitations of the 1990 American College of Rheumatology classification criteria in the diagnosis of vasculitis. *Ann Intern Med* 1998;129:345-352.
17. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994;37:187-92.
18. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65:1-11.
19. Watts RA, Jolliffe VA, Grattan CE, Elliott J, Lockwood M, Scott DG. Cutaneous vasculitis in a defined population: Clinical and epidemiological associations. *J Rheumatol* 1998;25:920-4.
20. Watts RA, Lane SE, Bentham G, Scott DG. Epidemiology of systemic vasculitis: A ten-year study in the United Kingdom. *Arthritis Rheum* 2000;43:422-7.
21. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C. Systemic vasculitis in adults in North Western Spain 1988-97. *Medicine* 1999;78:292-308.

22. Tidman M, Olander R, Slavender C, Danielsson D, et al. Patients hospitalized because of small vessel vasculitis with renal involvement in the period 1975-95: Organ involvement, antineutrophil cytoplasmic antibodies patterns, seasonal attack rates and fluctuation of annual frequencies. *J Intern Med* 1998;244:133-41.
23. Carlson JA, Ng BT, Chen KR. Cutaneous vasculitis update: diagnostic criteria, classification, epidemiology, etiology, pathogenesis, evaluation and prognosis. *Am J Dermatopathol* 2005;27:504-28.
24. Scott DGI, Watts RA. Systemic vasculitis: Epidemiology, classification and environmental factors. *Ann Rheum Dis* 2000;59:161-3.
25. Sais G, Vidaller A, Jucgla A, Servitje O, Condom E, Peyri J. Prognostic factors in leukocytoclastic vasculitis: a clinicopathologic study of 160 patients. *Arch Dermatol* 1998;134:309-15.
26. Swerlick RA, Lawley TJ. Cutaneous vasculitis: its relationship to systemic disease. *Med Clin North Am* 1989;73:1221-35.
27. Martinez-Taboada VM, Blanco R, Garcia-Fuentes M, Rodriguez-Valverde V. Clinical features and outcome of 95 patients with hypersensitivity vasculitis. *Am J Med* 1997;102:186-91.
28. Magro CM, Crowson AN. A clinical and histologic study of 37 cases of immunoglobulin A ó associated vasculitis. *Am J Dermatopathol* 1999;21:234-240.
29. Gibson LE. Cutaneous vasculitis update. *Dermatol Clin* 2001;19:603-615.
30. Jessop SJ. Cutaneous leucocytoclastic vasculitis: a clinical and aetiological study. *Br J Rheumatol* 1995;34:942-945.
31. Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA. Comparative clinical and epidemiological study of hypersensitivity vasculitis versus Henoch-Schönlein purpura in adults. *Semin Arthritis Rheum* 1999;28:404-12.
32. Ekenstam E, Callen JP. Cutaneous leukocytoclastic vasculitis. Clinical and laboratory features of 82 patients seen in private practice. *Arch Dermatol* 1984;120:484-489.
33. Hodge SJ, Callen JP, Ekenstam E. Cutaneous leukocytoclastic vasculitis: correlation of histopathological changes with clinical severity and course. *J Cutan Pathol* 1987;14:279-84.

34. Gyselbrecht L, De Keyser F, Ongenaes K, Naeyaert JM, Praet M, Veys EM. Etiological factors and underlying conditions in patients with leucocytoclastic vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:665-8.
35. Blanco R, Martínez-Taboada VM, Rodríguez-Valverde V, García-Fuentes M. Cutaneous vasculitis in children and adults. Associated diseases and etiologic factors in 303 patients. *Medicine (Baltimore)* 1998;77:403-18.
36. McCombs RP. Systemic "allergic" vasculitis. Clinical and pathological relationships. *JAMA* 1965;194(10):1059-64.
37. Winkelmann RK, Ditto WB. Cutaneous and visceral syndromes of necrotizing or allergic angiitis: a study of 38 cases. *Medicine (Baltimore)* 1964;43:59-89.
38. Mackel SE, Jordon RE. Leukocytoclastic vasculitis. A cutaneous expression of immune complex disease. *Arch Dermatol* 1982;118:296-301.
39. Handel DW, Roenigk HH Jr, Shainoff J, Deodhar S. Necrotizing vasculitis. Etiologic aspects of immunology and coagulopathy. *Arch Dermatol* 1975;111:847-52.
40. Chua SH, Lim JT, Ang CB. Cutaneous vasculitis seen at a skin referral centre in Singapore. *Singapore Med J* 1999;40:147-50.
41. Soter NA, Mihm MC Jr, Gigli I, Dvorak HF, Austen KF. Two distinct cellular patterns in cutaneous necrotizing angiitis. *J Invest Dermatol* 1976;66:344-50.
42. Grunwald MH, Avinoach I, Amichai B, Halevy S. Leukocytoclastic vasculitis--correlation between different histologic stages and direct immunofluorescence results. *Int J Dermatol* 1997;36:349-52.
43. Schroeter AL, Copeman PW, Jordon RE, Sams WM Jr, Winkelmann RK. Immunofluorescence of cutaneous vasculitis associated with systemic disease. *Arch Dermatol* 1971;104:254-9.
44. Kulthanan K, Pinkaew S, Jiamton S, Mahaisavariya P, Suthipinittharm P. Cutaneous leukocytoclastic vasculitis: the yield of direct immunofluorescence study. *J Med Assoc Thai* 2004;87:531-5.
45. Watts RA, Scott DG. Epidemiology of the vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:11-6.

46. Amoli MM, Thomson W, Hajeer AH, Calviño MC, Garcia-Porrúa C, Ollier WE, et al. HLA-DRB1*01 association with Henoch-Schönlein purpura in patients from northwest Spain. *J Rheumatol* 2001;28(6):1266-70.
47. Amoli MM, Matthey DL, Calviño MC, Garcia-Porrúa C, Thomson W, Hajeer AH, et al. Polymorphism at codon 469 of the intercellular adhesion molecule-1 locus is associated with protection against severe gastrointestinal complications in Henoch-Schönlein purpura. *J Rheumatol* 2001;28(5):1014-8.
48. Liu Z, Yang J, Chen Z, Gong R, Li L. Gene polymorphism in IL-1 receptor antagonist affects its production by monocytes in IgA nephropathy and Henoch-Schönlein nephritis. *Chin Med J (Engl)* 2001;114(12):1313-6.
49. Juvonen T, Juvonen J, Savolainen MJ. Is vasculitis a significant component of atherosclerosis? *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:3-10.
50. Jenette CJ, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *The New England Journal of Medicine* 1997;337(21):1512-1523.
51. Jenette JC, Milling DM, Falk RJ. Vasculitis affecting the skin: a review. *Arch Dermatol* 1994;130:899- 906.
52. Ioannidou DJ, Krasagakis K, Daphnis EK, Perakis KE, Sotsiou F, Tosca AD. Cutaneous small vessel vasculitis: an entity with frequent renal involvement. *Arch Dermatol* 2002;138(3):412-4.
53. Luqmani RA, Bacon PA, Moots RJ, Janssen BA, Pall A, Emery P, et.al. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM* 1994;87(11):671-8.
54. Carlson JA, Chen KR. Cutaneous vasculitis update: small vessel neutrophilic vasculitis syndromes. *Am J Dermatopathol* 2006;28(6):486-506.
55. Bajema IM, Bruijn JA. What stuff is this! A historical perspective on fibrinoid necrosis. *J Pathol* 2000;191(3):235-8.
56. Bacalja J, Bulimba-i S, Sredoja Ti-ma V, Ti-ljar M, Gale-i K, Gale-i Ljubanovi D, Kriflanac TM Skin and renal manifestations of pauci-immune small-vessel vasculitis. 22. Ljudevit Jurak International symposium of comparative pathology. Zagreb, Croatia. June 3-4, 2011.

57. Ratnam KV, Boon YH, Pang BK. Idiopathic hypersensitivity vasculitis: clinicopathologic correlation of 61 cases. *Int J Dermatol* 1995;34(11):786-9.
58. Sanchez NP, Van Hale HM, Su WP. Clinical and histopathologic spectrum of necrotizing vasculitis. Report of findings in 101 cases. *Arch Dermatol* 1985;121(2):220-4.
59. Cribier B, Couilliet D, Meyer P, Grosshans E. The severity of histopathological changes of leukocytoclastic vasculitis is not predictive of extracutaneous involvement. *Am J Dermatopathol* 1999;21(6):532-6.
60. Barnadas MA, Pérez E, Gich I, Llobet JM, Ballarín J, Calero F, et al. Diagnostic, prognostic and pathogenic value of the direct immunofluorescence test in cutaneous leukocytoclastic vasculitis. *Int J Dermatol* 2004;43(1):19-26.
61. Weck KE, Dal Canto AJ, Gould JD, O'Guin AK, Roth KA, Saffitz JE et al. Murine gamma-herpesvirus 68 causes severe large-vessel arteritis in mice lacking interferon-gamma responsiveness: a new model for virus-induced vascular disease. *Nat Med* 1997;3(12):1346-53.
62. Jennette JC. Implications for pathogenesis of patterns of injury in small- and medium-sized-vessel vasculitis. *Cleve Clin J Med* 2002;69 (2):33-8.
63. Romagnoli P, Ghersetich I, Lotti T. Langerhans cells and vasculitis. *Int Angiol* 1995;14:113-8.
64. Buckley CD, Rainger GE, Nash GB, Raza K. Endothelial cells, fibroblasts and vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(7):860-3.
65. Cid MC, Segarra M, García-Martínez A, Hernández-Rodríguez J. Endothelial cells, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and cytokines in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 2004;6(3):184-94.
66. Ryan T. Cutaneous vasculitis. In: Champion R, Burton J, Burns D, Breathnach SM, eds. *Textbook of Dermatology*. 6th ed. Oxford:Blackwell Scientific Publications; 1998. p.2155-2225.
67. Gell P, Coombs R. *Clinical Aspects of Immunology*. 1sted. Oxford:Blackwell;1963.
68. Sell S. Immunopathol. In: Sell S, ed. *Immunology, Immunopathology and Immunity*. 6thed. Washington, DC:ASM; 2003. p.235-239.

69. Wilson CB, Dixon FJ. Quantitation of acute and chronic serum sickness in the rabbit. *J Exp Med* 1971;134:7-8.
70. Fernandez HN, Henson PM, Otani A, Hugli TE. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J Immunol* 1978;120(1):109-15.
71. Baumann U, Köhl J, Tschernig T, Schwerter-Strumpf K, Verbeek JS, Schmidt RE, et al. A codominant role of Fc gamma RI/III and C5aR in the reverse Arthus reaction. *J Immunol* 2000;164(2):1065-70.
72. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Augmentation of reverse arthus reaction by mast cells in mice. *J Clin Invest* 1991;88(3):841-6.
73. Kaburagi Y, Hasegawa M, Nagaoka T, Shimada Y, Hamaguchi Y, Komura K, et al. The cutaneous reverse Arthus reaction requires intercellular adhesion molecule 1 and L-selectin expression. *J Immunol* 2002;168(6):2970-8.
74. Yanaba K, Kaburagi Y, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Relative contributions of selectins and intercellular adhesion molecule-1 to tissue injury induced by immune complex deposition. *Am J Pathol* 2003;162(5):1463-73.
75. Yanaba K, Komura K, Horikawa M, Matsushita Y, Takehara K, Sato S. P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for the development of cutaneous vasculitis induced by immune complex deposition. *J Leukoc Biol* 2004;76(2):374-82.
76. Burrows NP, Molina FA, Terenghi G, Clark PK, Haskard DO, Polak JM, et al. Comparison of cell adhesion molecule expression in cutaneous leukocytoclastic and lymphocytic vasculitis. *J Clin Pathol* 1994;47(10):939-44.
77. Cid MC. Endothelial cell biology, perivascular inflammation, and vasculitis. *Cleve Clin J Med* 2002;69:45-9.
78. Sais G, Vidaller A. Pathogenesis of exercise-induced urticarial vasculitis lesions: can the changes be extrapolated to all leukocytoclastic vasculitis lesions? *Arch Dermatol* 1999;135(1):87-9.
79. Sais G, Vidaller A, Peyrí J. Anticardiolipin antibodies in leukocytoclastic vasculitis. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:805-6.

80. Claudy A. Pathogenesis of leukocytoclastic vasculitis. *Eur J Dermatol* 1998;8:75-9.
81. Dauchel H, Joly P, Delpech A, Thomine E, Sauger F, Le Loet X, et al. Local and systemic activation of the whole complement cascade in human leukocytoclastic cutaneous vasculitis; C3d,g and terminal complement complex as sensitive markers. *Arch Dermatol* 1993;92:274-83.
82. Boom BW, Out-Luiting CJ, Baldwin WM, Westedt ML, Daha MR, Vermeer BJ, et al. Membrane attack complex of complement in leukocytoclastic vasculitis of the skin. Presence and possible pathogenetic role. *Arch Dermatol* 1987;123:1192-5.
83. Boom BW, Mommaas M, Daha MR, Vermeer BJ. Complement-mediated endothelial cell damage in immune complex vasculitis of the skin: ultrastructural localization of the membrane attack complex. *J Invest Dermatol* 1989;93:68-72.
84. Kawana S, Shen GH, Kobayashi Y, Nishiyama S. Membrane attack complex of complement in Henoch-Schönlein purpura skin and nephritis. *Arch Dermatol Res* 1990;282:183-7.
85. Acosta J, Qin X, Halperin J. Complement and complement regulatory proteins as potential molecular targets for vascular diseases. *Curr Pharm Des* 2004;10:203-11.
86. Stone JH. Targeted therapies in systemic vasculitis. *Cleve Clin J Med* 2002;69:124-8.
87. Langford CA, Sneller MC. Biologic therapies in the vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:3-10.
88. Booth A, Harper L, Hammad T, Bacon P, Griffith M, Levy J, et al. Prospective study of TNFalpha blockade with infliximab in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(3):717-21.
89. Goronzy JJ, Weyand CM. Cytokines in giant-cell arteritis. *Cleve Clin J Med* 2002;69:91-4.
90. Weyand CM, Goronzy JJ. Pathogenic mechanisms in giant cell arteritis. *Cleve Clin J Med* 2002;69:28-32.
91. Halliwell B, Gutteridge JMC 1989 The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine* (Halliwell B, Gutteridge JMC eds), Clarendon Press, Oxford, 1989, pp. 29-32.

92. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006;141:312-22.
93. Halliwell B. The biological significance of oxygen-derived species. In: *Active oxygen in biochemistry* (Valentine JS, Foote CS, Greenberg A, Liebman JF eds), Blackie Academic Professional, London 1995, pp. 313-335.
94. Feher J, Csomos G, Vereckei A. Physiological free radical reactions. In: *Free radical reactions in medicine* (Schlag G, Redl H eds), Springer-Verlag, Berlin. 1987, pp. 18-39.
95. Diplock AT. Antioxidants and free radical scavengers. In: *Free radical damage and its control* (Rice-Evans CA, Burdon RH eds), Amsterdam, Elsevier, 1994, pp. 113-130.
96. Pincemail J. Free radicals and antioxidants in human diseases. In: *Analysis of free radicals in biological systems* (Favier A, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre J-L eds), Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, 1995, pp. 83-98.
97. Sies H. Oxidative Stress: an introduction. In: *Oxidative stress oxidants and antioxidants*. (Sies H ed.), Academic Press, London, 1991, pp. 15-22.
98. Fivkovi M, Fiarkovi K, Krinjar Lj, Waeg G, Poljak-Blaffi M, Borovi M, Anji S, et al. A New Method for Detection of HNE-histidine Conjugates in Rat Inflammatory Cells. *Croat Chem Acta* 2005;78:91-98.
99. Svingen BA, O'Neal FO, Aust SD. The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochem Photobiol* 1978;28:803-9.
100. Smith WL, Marnett LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochem Biophys Acta*. 1991;1083:1-17.
101. Yamamoto S. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 1992;1128:117-31.
102. Brown RK, Kelly FJ. Peroxides and other products. In: *Free radicals: A practical approach* (Punchar N, Kelly F eds), Oxford University Press, Oxford, 1996, pp. 119-131.
103. Darley-Usmar VM, Mason RP, Chamulitrat W, Hogg N, Kalyanarman B. Lipid peroxidation and cardiovascular disease. In: *Immunopharmacology of free radical species* (Blake D, Winyard PG eds), Academic Press, London, 1995, pp. 23-37.
104. Porter N. Chemistry of lipid peroxidation, *Methods Enzymol* 1984;105:273-83.

105. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med* 1991;11:81-128.
106. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research* 2010;44:1098-124.
107. Dix TA, Aikens J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* 1993;6:2-18.
108. Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 1993;57:779-785.
109. Uchida K. Future of Toxicology/Lipid peroxidation in the Future: From biomarker to Etiology. *Chem Res Toxicol* 2006;20:3-5.
110. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutrition* 1993;57:715-724.
111. Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A, Duburs G, Horáková L, Luczaj W, et al. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radical Research* 2010;44:1216-62.
112. Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol* 2003;50:319-36.
113. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994;269:9397-400.
114. Rose RC. Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals: a radiation model. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;169:430-6.
115. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:1227-36.
116. Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* 2007;7:41-50.
117. Brigelius-Flohé R, Roob JM, Tiran B, Wuga S, Ribalta J, Rock E, et al. The effect of age on vitamin E status, metabolism, and function: metabolism as assessed by labeled tocopherols. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:40-3.

118. Talalay P, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD. Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv Enzyme Regul* 2003;43:121-34.
119. Uchida K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9:109-13.
120. Jaganjac M, Prah IO, Cipak A, Cindric M, Mrakovcic L, Tatzber F, et al. Effects of bioreactive acrolein from automotive exhaust gases on human cells in vitro. *Environ Toxicol* 2012;27:644-52.
121. Stevens JF, Maier CS. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(1):7-25
122. Yang Y, Yang Y, Trent MB, He N, Lick SD, Zimniak P, et al. Glutathione-S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004;173:211-21.
123. Uchida K, Kanematsu M, Morimitsu Y, Osawa T, Noguchi N, Niki E. Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1998;273:16058-66.
124. Alarcon RA. Formation of acrolein from various amino-acids and polyamines under degradation at 100 degrees C. *Environ Res* 1976;12(3):317-26.
125. Ghilarducci DP, Tjeerdema RS. Fate and effects of acrolein. *Rev Environ Contam Toxicol* 1995;144:95-146.
126. Furuhashi A, Nakamura M, Osawa T, Uchida K. Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols. *J Biol Chem* 2002;277:27919-26.
127. Noiri E, Yamada S, Nakao A, Tsuchiya M, Masaki I, Fujino K, et al. Serum protein acrolein adducts: utility in detecting oxidant stress in hemodialysis patients and reversal using a vitamin E-bonded hemodialyzer. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1651-6.
128. Szadkowski A, Myers CR. Acrolein oxidizes the cytosolic and mitochondrial thioredoxins in human endothelial cells. *Toxicology* 2008;243:164-76.

129. Zarkovic K, Uchida K, Kolenc D, Hlupic L, Zarkovic N. Tissue distribution of lipid peroxidation product acrolein in human colon carcinogenesis. *Free Radic Res* 2006;40:543-52.
130. Custovic Z, Zarkovic K, Cindric M, Cipak A, Jurkovic I, Sonicki Z, Uchida K, Zarkovic N. Lipid peroxidation product acrolein as a predictive biomarker of prostate carcinoma relapse after radical surgery. *Free Radic Res* 2010;44:497-504.
131. He G, Kutala VK, Kuppusamy P, Zweier JL. In vivo measurement and mapping of skin redox stress induced by ultraviolet light exposure. *Free Radic Biol Med* 2004;36:665-72.
132. Kaur S, Zilmer K, Leping V, Zilmer M. Serum methylglyoxal level and its association with oxidative stress and disease severity in patients with psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2013;305:489-94.
133. Shah AA, Sinha AA. Oxidative stress and autoimmune skin disease. *Eur J Dermatol* 2013;23:5-13.
134. Aly DG, Shahin RS. Oxidative stress in lichen planus. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2010;19:3-11.
135. Peroni DG, Bodini A, Corradi M, Coghi A, Boner AL, Piacentini GL. Markers of oxidative stress are increased in exhaled breath condensates of children with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2012;166:839-43.
136. Tanaka N, Tajima S, Ishibashi A, Uchida K, Shigematsu T. Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Arch Dermatol Res* 2001;293:363-7.
137. Sredoja Tisma V, Basta-Juzbasic A, Jaganjac M, Brcic L, Dobric I, Lipozencic J, Tatzber F, Zarkovic N, Poljak-Blazi M. Oxidative stress and ferritin expression in the skin of patients with rosacea. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:270-6.
138. Babior BM. Phagocytes and oxydative stress. *Am J Med* 2000;109:33-44.
139. Jaganjac M, Poljak-Blazi M, Schaur RJ, Zarkovic K, Borovic S, Cipak A, et al. Elevated neutrophil elastase and acrolein-protein adducts are associated with W256 regression. *Clin Exp Immunol* 2012;170:178-85.

140. Sbarra AJ, Karnovsky ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1959;234:1355-62.
141. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunol Cell Biol* 2001;79:502-6.
142. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha, beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1997;99:424-32.
143. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* 2000;190:343-8.
144. Weiss SJ, Regiani S. Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alpha-1-proteinase inhibitor. Cooperative use of lysosomal proteinases and oxygen metabolites. *J Clin Invest* 1984;73:1297-303.
145. Sindrilaru A, Seeliger S, Ehrchen JM, Peters T, Roth J, Scharffetter-Kochanek K, et al. Site of blood vessel damage and relevance of CD18 in a murine model of immune complex-mediated vasculitis. *J Invest Dermatol* 2007;127:447-54.
146. Djordjevi VB, Stankovi T, Cosi V, Zvezdanovi L, Kamenov B, Tasi -Dimov D, et al. Immune system-mediated endothelial damage is associated with NO and antioxidant system disorders. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1117-21.
147. Keskin N, Civilibal M, Elevli M, Koldas M, Duru NS, Ozturk H. Elevated plasma advanced oxidation protein products in children with Henoch-Schonlein purpura. *Pediatr Nephrol* 2011;26:1989-93.
148. Ozyazgan S, Andican G, Erman H, Tuzcu A, Uzun H, Onal B, et al. Relation of protein oxidation parameters and disease activity in patients with Behçet's disease. *Clin Lab* 2013;59:819-25.
149. Uchida K, Kanematsu M, Sakai K, et al. Protein-bound acrolein: Potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4882-67.

150. Saigal R, Agrawal A, Dadhich D. Vasculitis syndrome: an approach. *J Assoc Physicians India* 2004;52:645-8.
151. Merkel PA, Aydin SZ, Boers M, Direskeneli H, Herlyn K, Seo P, et al. The OMERACT core set of outcome measures for use in clinical trials of ANCA-associated vasculitis. *J Rheumatol* 2011;38:1480-6.
152. De Groot K, Harper L, Jayne DR, Flores Suarez LF, Gregorini G, Gross WL, et al. Pulse versus daily oral cyclophosphamide for induction of remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;150:670-680.
153. De Groot K, Rasmussen N, Bacon PA, Tervaert JW, Feighery C, Gregorini G, et al. Randomized trial of cyclophosphamide versus methotrexate for induction of remission in early systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2005;52:2461-69.
154. Jayne D, Rasmussen N, Andrassy K, Bacon P, Tervaert JW, Dadoniene J, et al. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N Engl J Med* 2003;349:366-74.
155. WGET Research Group. Etanercept plus standard therapy for Wegener's granulomatosis. *N Engl J Med*. 2005;352:351-61.
156. Jayne DR, Gaskin G, Rasmussen N, Abramowicz D, Ferrario F, Guillevin L, et al. Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2180-8.
157. Ti-hjar M, Tori L, Horvati I, Gale-i Ljubanovi D, Bulimba-i S, Sredoja Ti-ma V, Juri K, Pehar M, Gale-i K. Bubrefna bolest u vaskulitisu malih krvnih flila. Saffeci VI. Hrvatskog kongresa nefrologije, dijalize i transplantacije, Split 7.-10.10.2011, *Acta Med Croatica*, 2011;65(3):99-157.
158. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Guerrero J, Rodriguez-Ledo P, Llorca J. The epidemiology of the primary systemic vasculitides in northwest Spain: implications of the Chapel Hill Consensus Conference definitions. *Arthritis Rheum* 2003 Jun 15;49(3):388-93.
159. Terrier B, Semoun O, Saadoun D, Sène D, Resche-Rigon M, Cacoub P. Prognostic factors in patients with hepatitis C virus infection and systemic vasculitis. *Arthritis Rheum* 2011;63:1748-57.

160. Chen LP, Zhao J, Du Y, Han YF, Su T, Zhang HW, Cao GW. Antiviral treatment to prevent chronic hepatitis B or C-related hepatocellular carcinoma. *World J Virol* 2012;1:174-183.
161. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011;365:2067-77.
162. Lee SJ, Lim KT. UDN glycoprotein regulates activities of manganese-superoxide dismutase, activator protein-1, and nuclear factor-kappaB stimulated by reactive oxygen radicals in lipopolysaccharide-stimulated HCT-116 cells. *Cancer Lett* 2007;254:274-87.
163. Tai YJ, Chong AH, Williams RA, Cumming S, Kelly RI. Retrospective analysis of adult patients with cutaneous leukocytoclastic vasculitis. *Australas J Dermatol* 2006;47:92-6.
164. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2002 Sep 17;106(12):1439-41.
165. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2003 Oct 7;108(14):1676-78.
166. Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A, Bernelli-Zazzera A. Induction of Ferritin Synthesis by Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:700-703.
167. Biemond P, Van Eijk HG, Swaak AJG, Koster JF. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes: possible mechanism in inflammation diseases. *J Clin Invest* 1984;74:1576-1579..
168. Kus ML, Fairburn K, Blake D, Winyard PG. A vascular basis for free radical involvement in inflammatory joint disease. U: Blake D, Winyard PG. *Immunopharmacology of free radical species*. London, Academic Press, 1995. p. 97-112.
169. Korkmaz S, Erturan I, Naziroglu M, Uzun AC, Cibak, Övey IS. Colchicine modulates oxidative stress in serum and neutrophil of patients with Behçet disease through regulation of Ca²⁺ release and antioxidant system. *J Membr Biol* 2011;244:113-20.
170. Li KJ, Wu CH, Hsieh SC, Lu MC, Tsai CY, Yu CL. Deranged bioenergetics and defective redox capacity in T lymphocytes and neutrophils are related to cellular dysfunction and increased oxidative stress in patients with active systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:548516.

171. Verma P, Bhattacharya SN, Banerjee BD, Khanna N. Oxidative stress and leukocyte migration inhibition response in cutaneous adverse drug reactions. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2012;78:664.
172. Uzuno lu S, Acar H, Okudan N, Gökbel H, Mevlito lu I, Sari F. Evaluation of the association between null genotypes of glutathione-S-transferases and Behcet's disease. *Arch Dermatol Res* 2006;297:289-93.
173. Bekpinar S, Kiliç N, Unlüçerçi Y, Akdag-Köse A, Azizlerli G, Ozbek-Kir Z. Evaluation of nitrosative and oxidative stress in Behçet disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005 ;19:167-71.
174. Yazici C, Köse K, Cali M, Demir M, Kirnap M, Ate F. Increased advanced oxidation protein products in Behçet's disease: a new activity marker? *Br J Dermatol* 2004;151:105-11.
175. Sandikci R, Türkmen S, Güvenen G, Ayabakan H, Gülcan P, Koldas M, Ozbek Kir Z, Yenice N. Lipid peroxidation and antioxidant defence system in patients with active or inactive Behçet's disease. *Acta Derm Venereol* 2003;83:342-6.
176. Noyan T, Sahin I, Sekero lu MR, Dülger H. The serum vitamin C levels in Behçet's disease. *Yonsei Med J* 2003;44:771-8.
177. Taysi S, Kocer I, Memisogullari R, Kiziltunc A. Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behçet's disease. *Ann Clin Lab Sci* 2002;32:377-82.
178. Tüzün A, Aydın A, Turan M. Erythrocyte antioxidant activity and trace element levels in Behçet's disease. *Biol Trace Elem Res* 1998;64:169-74.
179. Köse K, Do an P, A çio lu M, Erkiliç K, A çio lu O. Oxidative stress and antioxidant defenses in plasma of patients with Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med* 1995;176:239-48.
180. Najim RA, Sharquie KE, Abu-Raghif AR. Oxidative stress in patients with Behcet's disease: I correlation with severity and clinical parameters. *J Dermatol* 2007;34:308-14.
- of patients with Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med* 1995;176:239-48.
181. Onur E, Kabaroglu C, Inanir I, Var A, Guvenc Y, Gunay O, Gunduz K. Oxidative stress impairs endothelial nitric oxide levels in Behçets' disease. *Cutan Ocul Toxicol* 2011 ;30:217-20.

182. Buldanlioglu S, Turkmen S, Ayabakan HB, Yenice N, Vardar M, Dogan S, et al. Nitric oxide, lipid peroxidation and antioxidant defence system in patients with active or inactive Behçet's disease. *Br J Dermatol* 2005;153:526-30.
183. Acikgoz N, Ermi N, Ya mur J, Cansel M, Karincaolu Y, Ata H, et al. Elevated oxidative stress markers and its relationship with endothelial dysfunction in Behçet disease. *Angiology* 2011;62:296-300.
184. Isik A, Koca SS, Ustundag B, Selek S. Decreased total antioxidant response and increased oxidative stress in Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med* 2007;212:133-41.
185. Sezer ED, Aksu K, Caglayan O, Keser G, Karabulut G, Ercan G. DNA damage and its relationship with other oxidative stress parameters in Behçet's disease. *Rheumatol Int* 2012 ;32:217-22.
186. Taysi S, Sari RA, Dursun H, Yilmaz A, Keles M, Cayir K, et al. Evaluation of nitric oxide synthase activity, nitric oxide, and homocysteine levels in patients with active Behçet's disease. *Clin Rheumatol* 2008;27:1529-34.
187. Yardim-Akaydin S, Sepici A, Ozkan Y, Sim ek B, Sepici V. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scand J Rheumatol* 2006;35:61-4.
188. Kandi B, Cicek D, Ilhan N. Vitamin levels in Behçet's disease. *J Dermatolog Treat* 2007;18:69-75.
189. Evereklioglu C, Er H, Türköz Y, Cekmen M. Serum levels of TNF-alpha, sIL-2R, IL-6, and IL-8 are increased and associated with elevated lipid peroxidation in patients with Behçet's disease. *Mediators Inflamm* 2002;11:87-93.
190. Harzallah O, Kerkeni A, Baati T, Mahjoub S. Oxidative stress: correlation with Behçet's disease duration, activity and severity. *Eur J Intern Med* 2008;19:541-7.
191. Sepici-Dinçel A, Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Kaymak-Karata G, Onder M, Sim ek B. The association between total antioxidant status and oxidative stress in Behçet's disease. *Rheumatol Int* 2006 ;26:1005-9.

192. Gulbahar O, Adisen H, Koca C, Aricioglu A, Gulekon A. Changes in serum carbonyl and malondialdehyde levels following colchicine and vitamin E treatment in Behcet's disease. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007;29:521-4.
193. Chambers JC, Haskard DO, Kooner JS. Vascular endothelial function and oxidative stress mechanisms in patients with Behçet's syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:517-20.
194. Ece A, Kelekçi S, Kocamaz H, Hekimo lu A, Balik H, Yolba I, Erel O. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and total antioxidant status in children with Henoch-Schönlein purpura. *Clin Rheumatol* 2008;27:163-9.
195. Buyan N, Erba D, Akkök N, Oz E, Biberolu G, Hasanolu E. Role of free oxygen radicals and prostanoids in the pathogenesis of Henoch-Schönlein Purpura. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998;59:181-4.
196. Erdoğan O, Oner A, Aydın A, İmer A, Demircin G, Bülbül M. Effect of vitamin E treatment on the oxidative damage occurring in Henoch-Schönlein purpura. *Acta Paediatr* 2003;92:546-50.
197. Ames PR, Alves J, Murat I, Isenberg DA, Nourooz-Zadeh J. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and allied conditions with vascular involvement. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:529-34.
198. Guilpain P, Servettaz A, Goulvestre C, Barrieu S, Borderie D, Chéreau C, et al. Pathogenic effects of antimyeloperoxidase antibodies in patients with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2455-63.
199. Serban MG, Blănescu E, Niş V. Lipid peroxidase and erythrocyte redox system in systemic vasculitides treated with corticoids. Effect of vitamin E administration. *Rom J Intern Med* 1994;32:283-9.
200. Silva-Fernández L, Loza E, Martínez-Taboada VM, Blanco R, Rúa-Figueroa I, Pego-Reigosa JM, et al. from the Systemic Autoimmune Diseases Study Group of the Spanish Society for Rheumatology (EAS-SER). Biological therapy for systemic vasculitis: A systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2013 Aug 23. pii: S0049-0172(13)00158-3. doi: 10.1016/j.semarthrit.2013.07.010. [Epub ahead of print]

201. Tsai KL, Chiu TH, Tsai MH, Chen HY, Ou HC. Vinorelbine-induced oxidative injury in human endothelial cells mediated by AMPK/PKC/NADPH/NF- κ B pathways. *Cell Biochem Biophys* 2012;62:467-79.
202. Yamada T, Egashira N, Bando A, Nishime Y, Tonogai Y, Imuta M, et al. Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radic Biol Med* 2012;52:1285-93.
203. Baliga RS, Chaves AA, Jing L, Ayers LW, Bauer JA. AIDS-related vasculopathy: evidence for oxidative and inflammatory pathways in murine and human AIDS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1373-80.
204. Gatica LV, Oliveros LB, Pérez Díaz MF, Domínguez NS, Fornes MW, Gimenez MS. Implication of vitamin A deficiency on vascular injury related to inflammation and oxidative stress. Effects on the ultrastructure of rat aorta. *Eur J Nutr* 2012;51:97-106.
205. Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, Sosnowska D, Wang M, Monticone RE, et al. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011;66:866-75.
206. Wu Z, MacPhee IA, Oliveira DB. Reactive oxygen species in the initiation of IL-4 driven autoimmunity as a potential therapeutic target. *Curr Pharm Des* 2004;10:899-913.
207. Wu Z, Turner DR, Oliveira DB. Antioxidants inhibit mercuric chloride-induced early vasculitis. *Int Immunol* 2002;14:267-73.
208. Kukongviriyapan U, Sompamit K, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Donpunha W. Preventive and therapeutic effects of quercetin on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and vascular dysfunction in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90:1345-53.

INTERNET IZVORI:

emedicine.medscape.com/dermatology

<http://www.testovi.info/hi-kvadrat-test-kalkulator.html>

8. SAŽETAK

Vaskulitis malih krvnih žila (VMKfi) je upala i oštećenje stijenke krvnih žila koje rezultira krvarenjem i/ili ishemijom. Postoje lokalizirani oblici bolesti u obliku benignog tijeka, koji ponekad mogu brzo progredirati u multisistemske, teške oblike bolesti. To ni patogenetski mehanizmi nastanka različitih oblika VMKfi nisu u potpunosti jasni. U histološkom nalazu VMKfi karakterističan je nalaz neutrofila, koji otpuštaju snažne upalne medijatore, uključujući i reaktivne kisikove spojeve (ROS), čije prekomjerno stvaranje oštećuje makromolekule kao što su lipidi i proteini. Nadalje, ROS mogu dovesti do lanane reakcije lipidne peroksidacije pri čemu nastaju reaktivni aldehidi, među kojima je i akrolein. Pretpostavka je da oksidacijski stres i akrolein imaju ulogu u patogenezi VMKfi. Stoga je cilj ovog istraživanja bio istražiti ulogu biomarkera oksidacijskog stresa u progresiji bolesti. U istraživanje je bilo uključeno 67 bolesnika s VMKfi i 30 zdravih ispitanika iz kontrolne skupine koji su po dobi i spolu prispodobivi bolesnicima s VMKfi. Istraživanje se sastojalo od određivanja ukupnog oksidacijskog kapaciteta u serumu, određivanja ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u serumu te imunohistokemijske analize akroleina u biopsijama žila. Biopsija žila uključena je u 67 bolesnika s VMKfi, a najčešći nalaz bio je leukocitoklastni vaskulitis. Ukupni oksidacijski kapacitet u serumu bio je viši, a ukupni antioksidacijski kapacitet bio je znatno niži u bolesnika s VMKfi u odnosu na zdrave ispitanike iz kontrolne skupine ($p < 0,05$). Intenzitet ekspresije akroleina bio je značajno veći u uzorcima žila bolesnika s VMKfi u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0,05$), a ekspresija akroleina bila je intenzivnija u bolesnika floridne faze i jačeg intenziteta bolesti. Uočene razlike u ekspresiji akroleina, povišenom ukupnom oksidacijskom kapacitetu te sniženom ukupnom antioksidacijskom kapacitetu ukazuju na ulogu oksidacijskog stresa u patogenezi bolesti. Iako većina VMKfi i dalje predstavlja blage i samoograničavajuće oblike bolesti, oni mogu biti i prvi znak ozbiljnijih sistemskih i multiorganskih oblika bolesti. Neliječeni bolesnici s teškim sistemskim oblicima bolesti imaju lošu prognozu, koja se može poboljšati brzim i pravilnim terapijskim pristupom. S obzirom da ovo istraživanje potvrđuje ulogu povišenog oksidacijskog stresa i snižene antioksidacijske obrane u nastanku i progresiji VMKfi, supresija oksidacijskog stresa može biti potencijalno korisna strategija u liječenju VMKfi. Stoga ova studija može pomoći u daljnjim istraživanjima mogući i primjene lijekova s antioksidacijskim svojstvima u liječenju bolesnika s VMKfi.

9. SUMMARY

Small-vessel vasculitis (SVV) is an inflammation of the vessel wall that can result in mural destruction, consequently leading to hemorrhage and/or ischemia. There are localized forms of SVV in the skin with benign course, which sometimes can rapidly progress to multisystem and severe disease. The underlying mechanisms of different forms of SVV is not completely understood. The characteristic histological findings in SVV are neutrophils that release powerful inflammatory mediators. Moreover, activated neutrophils release excessive reactive oxygen species (ROS) that can damage macromolecules, such as lipids and proteins. ROS can trigger chain reaction of lipid peroxidation leading to formation of reactive aldehydes such as acrolein. The assumption is that oxidative stress and acrolein are associated with the pathogenesis of SVV. Therefore, the aim of this study was to investigate the involvement of oxidative stress biomarkers in disease progression. This study included 67 patients with cutaneous SVV and 30 healthy controls that were age- and sex-matched with the patients. The investigation consisted of measurements of serum total oxidative capacity, serum total antioxidative capacity, and immunohistochemical analysis of acrolein in skin tissue samples. Skin biopsy was performed in 67 patients and the most common finding was leukocytoclastic vasculitis. Serum total oxidative capacity was higher and serum total antioxidative capacity was significantly lower in patients with SVV than in healthy control subjects ($p < 0,05$). Compared with control subjects, intensity of acrolein positivity was significantly higher ($p < 0,05$) in skin samples from patients with SVV especially those with severe disease. The observed differences in the expression of acrolein, higher total oxidative capacity, and lower total antioxidative capacity support the role of the oxidative stress in the pathogenesis of the disease. Although the most skin SVV represent mild, self-limited conditions, they could be the first sign of more serious systemic disease with multiorgan involvement. Untreated patients with severe systemic disease have a poor prognosis, which may be improved by prompt therapy. This investigation indicates that oxidative stress and altered antioxidant defenses are involved in the pathophysiology of small vessel vasculitis and disease progression. Therefore, the suppression of oxidative stress might be a potentially useful strategy for the treatment of small vessel vasculitis. This study may assist in the search for novel pharmacologic agents with antioxidant properties to treat affected patients.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21. ožujka 1974. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu školu i Klasičnu gimnaziju.

Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sam diplomirala 2000. i stekla stručni naziv doktor medicine. Pripravnički staž sam obavila 2000. u KB Dubrava.

2001. sam položila stručni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva RH i stekla odobrenje Hrvatske liječničke komore za samostalni rad na poslovima doktora medicine.

2001. sam radila kao liječnik opće medicine u Domu zdravlja Flejšezničar, a 2002. kao liječnik stručni suradnik u Krka farma doo.

Specijalizaciju iz dermatologije i venerologije započela sam 2002 u KB Dubrava, a najveći dio specijalizantskog staža provela sam u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof.dr.sc. Ivana Dobrića. Specijalistički ispit iz dermatovenerologije položila sam 2007. u Klinici za kožne i spolne bolesti KBC-a i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U tijeku specijalizacije završila sam stručni poslijediplomski studij iz dermatovenerologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2003. do 2007. sam pohađala znanstveni poslijediplomski studij biologije, smjer fiziologija-imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

2005. sam prošla edukacijski trening u metodama imunohistokemijskog određivanja feritina u zdravom i patološkom tkivu te određivanja parametara oksidacijskog stresa i antioksidacijskog potencijala u serumu u Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. 19.02.2007. obranila sam magistarski rad *"Uloga oksidacijskog stresa i feritina u bolesnika s rozacejom"*, pod mentorstvom dr.sc. Marije Poljaković Blaffi te stekla akademski naziv magistra znanosti iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstvenog polja biologije.

2009. sam pohađala Međunarodni tečaj dermatoskopije u Grazu, a 2011. Alergološku akademiju na UCB Institute of Allergy Academy u Berlinu.

Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Juraj Strossmayer u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu upisala sam 2011. godine.

U stalnom sam radnom odnosu na radnom mjestu doktora medicine, specijalista dermatologije i venerologije u Kabinetu za kožne i spolne bolesti u KB Dubrava Zagreb.

lan sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog dermatovenerološkog društva, multidisciplinarnog tima KB Dubrava za dijagnostiku i liječenje vaskulitisa, International Dermoscopy Society te EADV - European Academy of Dermatology and Venerology. Udana sam, majka troje djece.

Popis radova i aktivnih sudjelovanja na kongresima

ZNANSTVENI RADOVI

1. **Sredoja Tišma V**, Bulimbašić S, Jaganjac M, Stjepandić M, Larša M. Progressive pigmented purpuric dermatitis and alopecia areata as unusual skin manifestations in recognizing hereditary hemochromatosis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2012;20(3):187-192.
2. **Sredoja Tišma V**. Poljak-Blaffi M. Uloga oksidacijskog stresa i željeza u patofiziologiji rozaceje. *Liječnič. vjesnik* 2011;133:288-291.
3. **Sredoja Tišma V**, Basta-Juzbašić A, Jaganjac M, Brčić L, Dobrić I, Lipozenčić J, Tatzber F, Fiarković N, Poljak-Blaffi M. Oxidative stress and ferritin expression in the skin of rosacea patients. *J Am Acad Dermatol* 2009;60(2):270-276. **Current Contents**
4. Ljubojević S, Milavec-Puretić V, **Sredoja Tišma V**, Radošević J, Kalauz M, Hršić I. Pyoderma gangrenosum associated with ulcerative colitis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2006;14(1):35-9.
5. **Sredoja Tišma V**, Dobrić I, Pašić A. Hereditary Benign Teleangiectasia. *Acta Dermatovenerol Croat* 2004;12(3):169-172.
6. **Sredoja Tišma V**, Basta-Juzbašić A, Dobrić I, Ljubojević S, Bukvić-Mokos Z. Etiopathogenesis, Classification, and Current Trends in Treatment of Rosacea. *Acta Dermatovenerol Croat* 2003;11(4):236-246.

SAŽETCI U ZBORNICIMA SKUPOVA

1. Mitrović J, Horvatić I, **Sredoja Tišma V**, Morović -Vergles J. Glomerulonefritis u Henoch-Schönleinovoj purpuri - prikaz bolesnice. Sažeci XV kongresa Hrvatskog reumatološkog društva, Split 17.- 20.10. 2013, *Reumatizam*, 2013;60(2):93.
2. Tišjar M, Torić L, Horvatić I, Galešić Ljubanović D, Bulimbašić S, **Sredoja Tišma V**, Jurić K, Pehar M, Galešić K. Bubrežna bolest u vaskulitisu malih krvnih žila. Sažeci VI. Hrvatskog kongresa nefrologije, dijalize i transplantacije, Split 7.-10.10.2011, *Acta Med Croatica*, 2011;65(3):99-157.

3. Bacalja J, Bulimba-*i* S, **Sredoja Tišma V**, Ti-*l*jar M, Gale-*i* K, Gale-*i* Ljubanovi D, Kriflanac TM Skin and renal manifestations of pauci-immune small-vessel vasculitis. 22. Ljudevit Jurak International symposium of comparative pathology. Zagreb, Croatia. June 3-4,2011.
4. Budim *i* D, **Sredoja Tišma V**, Per-*i* Vojinovi S, Ljubojevi S. A retrospective study of the pattern of syphilis and gonorrhoea between 1990 and 2004 in the Department of Dermatology and Venerology Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia. 22nd IUSTI-Europe Conference on Sexually Transmitted Infections. 19-21 October 2006. International Journal of STD & AIDS, 2006;17(1):50.
5. Pa-*i* A, Dobri I, **Sredoja Tišma V**. Hereditary benign teleangiectasia ó a case report from Croatia. Journal of the European Academy for Dermatology and Venereology. Abstracts of the 13th Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology. Lotti T, Freedman D. (ur.). Florence, Italy : Blackwell Publishing, 2004;18(2):477.
6. Ljubojevi S, Milavec-Pureti V, **SredojaTišma V**, Rado-*J*. Pyoderma gangrenosum associated with ulcerative colitis. Journal of the European Academy for Dermatology and Venereology. Abstracts of the 13th Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology. Lotti T, Freedman D. (ur.). Florence, Italy : Blackwell Publishing, 2004;18(2):445.