

Morfometrija i statička DNA citometrija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom

Smojver-Ježek, Silvana

Doctoral thesis / Disertacija

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:031551>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-18**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Silvana Smojver-Ježek

**Morfometrija i statička DNA
citometrija makrofaga u
bronhoalveolarnom ispirku bolesnika
sa sarkoidozom**

DISERTACIJA

ZAGREB, 2009.

Ova disertacija izrađena je u Citološkom laboratoriju Klinike za plućne bolesti „Jordanovac“ u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Tatjana Peroš-Golubičić

Zahvaljujem

svojoj mentorici prof.dr.sc. Tatjani Peroš-Golubičić na idejama, strpljenju i nesebičnom poticanju,

doc.dr.sc. Iki Kardum-Skelin na inicijativi i pomoći,

glavnoj tehničarki, med.lab.ing Ivančici Peharec i ostalim tehničarkama, te kolegicama Citološkog laboratorija, prim. dr. sc. Mariji Alilović i prim. dr.sc. Jasni Tekavec-Trkanjec na pomoći i razumijevanju, gosp. Adilu Džuburu iz firme Vamstec na velikodušnosti,

dragim učiteljima prim. Mihovilu Rogliću i prim.mr.sc. Ivanu Pongracu na ukazanom povjerenju.

Ovaj rad posvećujem Miroslavi, Vladimiru, Leu i Damiru.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Sarkoidoza	1
1.1.1. Definicija, epidemiologija, patogenezna	1
1.1.2. Klinička slika	4
1.1.3. Apoptoza u sarkoidozi	6
1.2. Dijagnostičke metode	8
1.2.1. BAL	8
1.2.2. Ostale bronhoskopske metode uzimanja uzoraka	11
1.2.3. Radiološke pretrage	13
1.2.4. Mikroskopska morfološka dijagnoza	13
1.2.4.1. Citološka dijagnoza	15
1.2.4.2. Patohistološka dijagnoza	16
1.2.4.3. Bolesnici bez mikroskopske morfološke dijagnoze	17
1.3. Plućni makrofagi	20
1.3.1. Vrste i uloga plućnih makrofaga	20
1.3.2. Morfologija makrofaga u BAL-u	21
1.4. Morfometrija i statička DNA citometrija	23
1.4.1. Morfometrija	23
1.4.2. Statička DNA citometrija	25
1.4.3. Značenje morfometrijske i DNA analize	29
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
3. METODE RADA	34
3.1. Kriteriji za uključivanje ispitanika	34
3.2. Bronhoalveolarno ispiranje i obrada ispirka	34
3.3. Morfometrija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku	35
3.4. Podaci prikupljeni tijekom istraživanja	37
3.5. Statističke metode	38
4. REZULTATI	39
4.1. Opće karakteristike ispitivanih skupina	39
4.2. Morfometrijski i DNA citometrijski parametri jezgara makrofaga ispitanika	44
4.2.1. Površina	44
4.2.2. Opseg	48
4.2.3. Konveksnost	50
4.2.4. Duljina	52

4.2.5. Debljina	54
4.2.6. Najveći polumjer	57
4.2.7. Najmanji polumjer	60
4.2.8. Faktor oblika (FF)	62
4.2.9. Faktor izduženosti (FF izd)	65
4.2.10. Površina/konveksnost (ACA)	67
4.2.11. Analiza DNA histograma	70
4.3. Morfometrijske i citometrijske karakteristike pojedinih skupina bolesti	73
4.4. Identifikacija morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara za razlikovanje sarkoidoze akutnog i kroničnog oblika	74
5. RASPRAVA	82
6. ZAKLJUČCI	93
7. SAŽETAK	95
8. SUMMARY	97
9. LITERATURA	99
10. ŽIVOTOPIS	108

POPIS OZNAKA I KRATICA:

ACA = površina/konveksnost (*engl. area/convex area*)

AIP = akutna intersticijska pneumonija

APC – antigen prezentirajuća stanica

ATS = Američko društvo za torakalne bolesti (*engl. American Thoracic Society*)

BAL = bronhoalveolarni ispirak (*engl. bronchoalveolar lavage*)

BOOP = bronhiolitis obliterans s organiziranom pneumonijom

BPI = bolesti plućnog intersticija

CMV = citomegalovirus

ConvA = konveksnost (*engl. convex area*)

DBVT = difuzna bolest vezivnog tkiva

DI = DNA indeks

DIP = deskvamativna intersticijska pneumonija

DNA = deoksiribonukleinska kiselina

ERS = Europsko društvo za respiratorne bolesti (*engl. European Respiratory Society*)

FF = faktor oblika

FF izd = faktor izduženosti

IOD = integrišana optička gustoća

IL = interleukin

INF = interferon

IPF – idiopatska plućna fibroza

K= kontrola

LIP = limfomatoidna intersticijska pneumonija

Max = najveća vrijednost

MaxR = najveći polumjer

Med = medijan

Min = najmanja vrijednost

MGG = May-Grünwald –Giemsa

MinR = najmanji polumjer

NS = ne-sarkoidoza

NSIP = nespecifična intersticijska pneumonija

PAS = *periodic acid-Schiff*

Pr = prosjek

RB-ILD = intersticijska pneumonija povezana s respiratornim bronhiolitisom

S = sarkoidoza

S1 = sarkoidoza akutna

S2 = sakroidoza kronična

SD = standardna devijacija

UIP = obična intersticijska pneumonija

TGF = transformirajući faktor rasta

TNF = faktor tumorske nekroze

WASOG = Svjetska udruga za sarkoidozu i druge granulomatoze (*engl. World Association for Sarcoidosis and other Granulomatous Disease*)

1. UVOD

1.1. SARKOIDOZA

1.1.1. Definicija, epidemiologija, patogeneza

Sarkoidoza je multisistemna granulomatoza nepoznate etiologije. Budući da najčešće zahvaća pluća, svrstana je među bolesti plućnog intersticija.

Bolesti plućnog intersticija obuhvaćaju heterogenu skupinu bolesti kojima je zajednička rasprostranjena infiltracija plućnog parenhima upalnim ili zloćudnim stanicama, vezivnim tkivom ili tekućinom^{1,2,3}. Bolesti plućnog intersticija čine oko 15% plućne patologije, tijekom bolesti je najčešće kroničan. Postoje brojne podjele bolesti plućnog intersticija (BPI). Jedna od najraširenijih podjela je ona prema uzroku, odnosno da li je uzrok poznat ili neopoznat. Najjedostavnija je podjela na skupine: bolesti poznatog uzroka, fibrozirajuće alveolitise, granulomatoze i rijetke bolesti plućnog intersticija (tablica 1).

Sarkoidozu se ranije smatralo rijetkom bolešću. Pojavljuje se u oba spola, sve rase širom svijeta su zastupljene, iako postoje određene etničke razlike u pojavljivanju. Tako u SAD-u Afroamerikanci obolijevaju češće nego bijelci, Irci češće nego Englezi. Sarkoidoza se najčešće javlja u mlađih žena i to između 20. i 40. godine života. U Japanu je tako omjer oboljelih žena i muškaraca 3:1, Španjolskoj 2:1, a u Velikoj Britaniji je podjednaki omjer oboljelih žena i muškaraca. U Hrvatskoj je sarkoidoza također nešto češća u žena nego u muškaraca, omjer u hospitaliziranih bolesnika je 1,4:1. Češća je u nepušača, a najveći broj oboljelih je u proljeće i ljeto. Također je zamijećeno da se sarkoidoza često pojavljuje unutar obitelji, podaci za Finsku navode 3,6%, Japan 8,7%, a u Hrvatskoj je 2% za hospitalizirane bolesnike. Prevalencija sarkoidoze u svijetu varira, najveća je u Švedskoj i to 19/100.000, a najmanja u Italiji 0,5/100.000, Japanu 1, Poljskoj 1,2/100.000, te Španjolskoj 1,4/100.000 osoba na godinu⁴. Prema podacima Odjela za statistiku Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u bolnicama Hrvatske se zbog sarkoidoze prosječno godišnje liječi oko 200 osoba. Prevalencija hospitaliziranih bolesnika u Hrvatskoj iznosi oko 4,1/100.000 stanovnika. Postoje razlike obzirom na geografsku rasprostranjenost sarkoidoze u Hrvatskoj. Najveća je prevalencija oboljelih u Požeško-Slavonskoj županiji (8,1/100.000), županiji Grad Zagreb (6,9/100.000) i Međimurskoj županiji (6,3/100.000), a najmanja u Primorsko-Goranskoj i Istarskoj županiji s 2,5/100.000 stanovnika. Mortalitet kod bolesnika sa

sarkoidozom je od 2-4%, uzrok smrti najčešće je respiratorna insuficijencija, poremećaj ritma u sarkoidozi srca, te insuficijencija bubrega⁵.

Tablica 1. Klasifikacija bolesti plućnog intersticija (BPI) Preuzeto iz Peroš-Golubičić⁶ i modificirano.

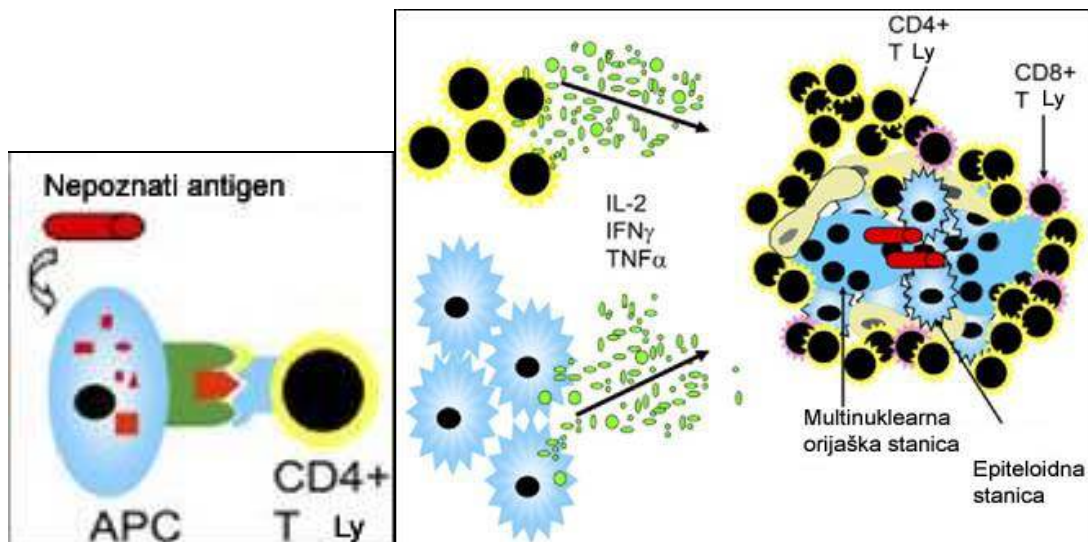
BPI poznatog uzroka	Pneumokonioze, hipersenzitivni pneumonitis, plinovi, pare, lijekovi, zračenje, živi uzročnici
Fibrozirajući alveolitisi (FA)	Idiopatske, intersticijske pneumonije: UIP, NSIP, BOOP, AIP, DIP, LIP, RB-ILD, FA uz DBVT, FA zbog lijekova, tvari iz okoliša
Granulomatoze	Sarkoidoza, histiocitoza Langerhansovih stanica, Wegenerova granulomatoza, Churg-Straussov sindrom
Rijetke BPI	Alveolarna proteinoza, alveolarna mikrolitijaza, amiloidoza, eozinofilne pneumonije, limfangioleiomiomatoza, idiopatska plućna hemosideroza, neurofibromatoza, tuberozna skleroza

Genetska sklonost za sarkoidozu dokazana je studijama u različitim etničkim skupinama i obiteljima. Prvi dokazi datiraju iz 1920-ih, kada su opisani prvi slučajevi akutne sarkoidoze među rođacima^{7,8}. Geni HLA klase I i klase II vrlo su polimorfni, važni su u imunskom odgovoru, a pokazano je da su neki, kao HLA-DRB1*1501 i *0201 povezani sa povećanom sklonošću obolijevanja od sarkoidoze, dok su drugi, kao HLA-DRB1*04 zaštitni. Grubić i sur. pokazali su da haplotipovi HLA-B8 - DRB1*0301, - DQB*0201 genetski i primarno određuju sklonost za sarkoidozu u hrvatskoj populaciji. Također, bolesnici s ovakvim haplotipom imaju i veću vjerojatnost akutnog početka bolesti, radiološkog stadija I i Lofgrenovog sindroma, odnosno ne zahtijevaju imunosupresivnu terapiju⁸. Suprotno, grupa bolesnika bez terapije pokazala je znatno manju prisutnost HLA-B15 i DRB1*04 specifičnost.

Etiologija sarkoidoze nije poznata, kao mogući uzroci spominju se mikobakterije, *Propionibacterium acnes*, *P. granulosum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Borelia burgdorferi*, herpes virusi, retrovirusi, anorganske tvari (insekticidi, cirkonij), lijekovi (interferon), ali bez do sada dokazane povezanosti^{9,10}. Iz navedenog, danas se smatra da je sarkoidni granulom rezultat odgovora u genetski predisponirane osobe na jedan ili više mikroorganizama koji se ponašaju na neinfektivan način, ili neke nežive tvari iz okoliša^{3,11}.

Granulom koji u sarkoidozi nastaje u zahvaćenim organima i tkivima rezultat je nakupljanja CD4+T limfocita i posljedičnog Th-1 imunskog odgovora^{2,3}. Imunosna zbivanja imaju presudnu ulogu u nastajanju sarkoidoze. Inicijalni odgovor na antigen vodi do stvaranje granuloma, a daljnja evolucija granuloma do rezolucije ili do kronične bolesti. U akutno nastaloj slici granulomi su posljedica zbivanja započetih prepoznavanjem antigena pomoću T-pomagačkih limfocita. Ove antigene prezentiraju antigen prezentirajuće stanice kao što su makrofagi, dendritičke stanice i ponekad B limfociti. Procesiranje antigena unutar antigen prezentirajuće stanice neophodno je za njegovu prezentaciju T limfocitu. Dolazi do enzimatske degradacije antigena i vezanja za polimorfne molekule HLA razreda I i II^{12,8}. CD4 pozitivni T limfociti uključeni su stanični imunski odgovor ili promoviraju aktivaciju, rast i diferencijaciju B stanica. S druge strane, CD8 pozitivni T limfociti suprimiraju imunski odgovor, ili su uključeni u citotoksičnu aktivnost¹². Slika 1.

CD4 pozitivni T limfociti spontano oslobađaju INF- γ , IL-2 i druge citokine. Makrofagi se takođe ponašaju kao sekretorne stanice i luče niz citokina: TNF- α , IL-12, IL-15, IL-8 i razne faktore rasta. Ključnu ulogu u formiranju granuloma ima i IL-18. Za nakupljanje imunokompetentnih stanica i stvaranje granuloma odgovorni su redistribucija stanica iz krvi koju modeliraju brojni kemotaktični citokini (IL-8, IL-5, IL-26, RANTES) i in-situ proliferacija potencirana IL-2, lokalnim faktorom rasta za limfocite¹³.



Slika 1. Antigen prezentirajuća stanica (APC) prezentira nepoznati antigen CD4+ T limfocitima. Nastupa proliferacija T limfocita i APC uz oslobađanje citokina, što vodi formiranju granuloma. Preuzeto i modificirano prema Grunewald i sur.¹³.

Nastali granulom sastoji se od makrofaga, epiteloidnih stanica pretežno tipa Langhans, te različito brojnih limfocita. Granulomi predstavljaju aktivnu bolest, remete arhitekturu u gotovo svim organima, ali se bolest klinički očituje najčešće samo u plućima i očima gdje remete funkciju, te na vidljivoj koži i limfnim čvorovima. Većina granuloma doživi spontanu rezoluciju unutar 2-5 godina. IL-12 posreduje održavanje, a IL-10 rezoluciju granuloma. U malog broja bolesnika razvija se progresivna fibroza, ili zaostaju fibrotične promjene. S kroničnom bolešću poveznici su IL-8, IL-12 i TNF- α ^{14,15,16,17,18}.

1.1.2. Klinička slika sarkoidoze

Bez obzira na lokalizaciju, sarkoidoza se može pojaviti u primarno akutnom ili kroničnom obliku (tablica 2). U oko 10% bolesnika bolest se slučajno otkriva^{3,19}. U akutnom pojavnom obliku sarkoidoze česti su malaksalost, inapetencija i vrućica.

Posebni oblik akutne sarkoidoze mlađih odraslih je Löfgrenov sindrom, karakteriziran vrućicom, pojavom nodoznog eritema, povećanih limfnih čvorova hilusa i artralgijsima, uz keratokonjunktivitis i iridociklitis. Heerfordt-Waldenströmov sindrom je oblik akutne sarkoidoze u kojem su uz vrućicu povećane parotidne žlijezde, te se nađe anteriorni uveitis i paraliza ličnog živca.

Tablica 2. Razlike između akutnog i kroničnog oblika sarkoidoze. Preuzeto iz Peroš-Golubičić T.³

	Akutna sarkoidoza	Kronična sarkoidoza
Dob	ispod 30 godina	iznad 40 godina
Početak	naglo	postupno
Radiogram pluća	bihilarna limfadenopatija	promjene plućnog parenhima
Oči	akutni iritis i konjunktivitis	keratokonjunktivitis, kronični uveitis
Koža	nodozni eritem, makulopapulozni osip	lupus pernio, plakovi
Histološki nalaz	epiteloidne i orijaške stanice	epiteloidne i orijaške stanice, fibroza
Spontana remisija	česta	rjeđa
Prognoza	dobra	lošija

Primarno kronični pojavni oblik plućne sarkoidoze karakteriziran je već u početku bolesti izraženim plućnim promjenama. U više od 80% slučajeva bolest zahvaća intratorakalne strukture. Mogu biti zahvaćeni medijastinalni/hilarni limfni čvorovi, plućni parenhim i rijetko veliki bronhi i pleura^{3,19}. Plućna sarkoidoza uglavnom je bolest parenhima, upalom su zahvaćeni alveole, mali bronhi i male krvne žile. Granulomi u bolesnika sa plućnom sarkoidozom mogu se pojaviti na bilo kojoj lokalizaciji, ali su česti uz bronhovaskularne snopiće. Granulomi su češći u gornje dvije trećine pluća, intralobularnim septama i subpleuralno. Naravni tijek bolesti različit je u bolesnika sa akutnom i kroničnom sarkoidozom^{1,3}.

Ekstratorakalni organi koji mogu biti zahvaćeni u sarkoidozi po redoslijedu učestalosti su: jetra, koža - tip nodoznog eritema, zglobovi, akutne promjene, periferni limfni čvorovi, koža – kronične forme, srce, slinovnice, slezena, neurosarkoidoza, a sve ostale lokalizacije su puno rjeđe^{1,3}.

Radiološke promjene u 60-90% neliječenih bolesnika sa akutnom sarkoidozom nestaju, smanjuju se ili se stabiliziraju^{1,3,19}. Uočeno je da su povoljni prognostički znakovi prisutnost nodoznog eritema, artritisa i vrućice. Kronična kožna sarkoidoza, splenomegalija i zahvaćenost kožnog sustava, dob iznad 40 godina, udruženi su sa lošijom prognozom.

Kronična plućna sarkoidoza je bolest u koje simptomi perzistiraju dulje od dvije godine. Perzistencijom i progresijom bolesti dolazi do destrukcije alveolarne arhitekture i razvoja plućne fibroze³.

Uz dijagnozu i proširenost sarkoidoze, važno je utvrditi i njezinu aktivnost. Uz spomenute klasične kliničke znakove, postoji niz biokemijskih i imunoloških biljega: aktivnost angiotenzin konvertaze, hiperkalcemija/hiperkalcurija, sIL-2R, povišen broj CD4 pozitivnih T limfocita u BAL-u, hipergamaglobulinemija^{3,20}. Za procjenu aktivnosti bolesti važno je i pojačano nakupljanje radioaktivnog galija, radioaktivnog talija ako se sumnja na sarkoidozu srca, te nalaz kompjuterizirane tomografije visoke rezolucije (HRCT)^{3,21}.

Spontana remisija nađe se u oko 2/3 bolesnika, a u ostalih 10-30% tijekom može biti kroničan ili progresivan. Identifikacijom bolesnika sa sklonošću spontanij remisiji možemo izbjeći nepotrebno liječenje bolesnika¹⁴.

1.1.2. Apoptoza u sarkoidozi

Apoptoza ili programirana stanična smrt je fiziološki, genetski kontroliran stanični odgovor na vanjske i unutarnje poticaje sa svrhom eliminiranja inficiranih ili neželjenih stanica^{22,23,24,25}. Apoptotičke stanice podliježu smanjenju (smanjenje volumena), dolazi do kondenzacije kromatina, kariorekse, sve do apoptotičkih tjelešca.

Na taj način prevenira se oštećenje okolnih stanica ili tkiva. Različiti faktori mogu stimulirati ili inhibirati apoptozu svojim djelovanjem: proapoptotički Bax, Bak, Bad, Bcl-X_s, TNF/TNFR1, Fas/FasL, porodica kaspaza, te neki antiapoptotički: Bcl-2 porodica gena, Bcl XL, CED-9, hsp, proteini-inhibitori apoptoze^{22,26}.

Obilježje sarkoidnih granuloma je da ne nalazimo nekrozu, neovisno o njihovoj starosti. Makrofagi se dijelom transformiraju u nezrelije oblike i migriraju iz lezije²⁷. Da bi došlo do rezolucije bez produžene upale, nastanka nekroze ili nastanka fibroze, potrebno je ukloniti epiteloidne stanice, fibroblaste i upalne stanice bez štetnih posljedica, što je moguće pomoću apoptoze²³. Apoptoza traje 12-18 sati, mitozu nešto manje, uz znatne individualne razlike. Pretpostavlja se da je veći broj stanica izgubljenih apoptozom nego onih nadomještenih mitozom, te je migracija novih stanica puno važnija u održavanju veličine granuloma²⁷. Ravnoteža između proapoptotičkih i antiapoptotičkih faktora utječe na rezoluciju upalnog procesa ili razvoj bolesti²². Većina dokaza upućuje na poremećenu apoptozu u sarkoidozi, većinom inaktivaciju apoptotičkih puteva^{22,28}. Produženje upale u kroničnoj sarkoidozi modulirano je specifičnim citokinima, kao što su IL-8, TGF- α i INF γ koji podržavaju upalu i formiranje granuloma, ali i njihovo povlačenje vodi do indukcije apoptoze. Same apoptotičke stanice mogu proizvoditi imunomodulatorne faktore, kao što su IL-10 i TGF- β , koji sudjeluju u rezoluciji granuloma bolesti¹⁷. Sarkoidozu karakterizira povećana proliferacija i smanjena apoptoza, a rezultat je akumulacija i produženo preživljenje T pomagačkih limfocita i aktiviranih makrofaga²⁸. Ovi događaji izraženiji su u akutnom pojavnom obliku sarkoidoze – Löfgrenovoj bolesti u koje rezolucija nastupa spontano²⁸. Brojni su dokazi o apoptotičkom djelovanju ili poremećenoj apoptozi u bolesnika sa kroničnom sarkoidozom. Tako je Fas antigen i ligand uključen u smanjivanje imunih reakcija indukcijom apoptoze. BAL limfociti bolesnika sa sarkoidozom pokazuju ne-apoptotičku morfologiju udruženu sa endogenom aktivnošću kaspaze 3. Usprkos povećanoj Fas ekspresiji, BAL limfociti bolesnika sa sarkoidozom resistantni su na indukciju apoptoze, što može pogodovati nakupljanju upalnih stanica u plućima, održavanju upale, razvoju i

perzistenciji granuloma. Citokini kao TNF α i INF γ važni su za formiranje granuloma, a njihovo povlačenje i/ili indukcija apoptoze igraju ulogu u rezoluciji granuloma¹⁶. Povećana Fas ekspresija nađena je u citoplazmi epiteloidnih stanica i multinuklearnih orijaških stanica unutar granuloma, kao i u limfocitima i makrofagima BAL-a bolesnika sa sarkoidozom^{15,23}. Ekspresija antiapoptotičkog bcl-2 proteina također je visoka u limfocitima koji okružuju granulome bolesnika sa sarkoidozom, ali i BAL limfocitima i makrofagima u aktivnih sarkoidoza. Korelira pozitivno i sa CD4/CD8 omjerom i može poslužiti kao marker aktivnosti bolesti^{16,26}.

Analiza apoptoze monocita/makrofaga u sarkoidozi u nekim studijama dala je konfliktne rezultate, od povećane apoptoze, do nesposobnosti makrofaga da podlegnu apoptozi²⁹. Rutherford i sur. pokazali su da je povećana regulacija genskih produkata, naročito porodice Bcl-2 i gena faktora rasta udružena sa antiapoptotičkim statusom i preživljenjem stanica u sarkoidozi, ispitivana na mononuklearnim stanicama periferne krvi³⁰. Pretpostavlja se da nepoznati antigen u sarkoidozi može djelovati na već poremećenom sustavu u kojem ne djeluju antiproliferativni mehanizmi, što može voditi u prolongiranu upalnu bolest, pa tako i aktivnu sarkoidozu kroničnog tijeka. Niz dokaza govori u prilog inaktivacije intrinzičnih, ekstrinzičnih i alternativnih apoptotičkih puteva u sarkoidozi^{28,30}. Drugi nisu našli razlike između proapoptotičkih (Bax, Bcl-X_s, TNFR1) i antiapoptotičkih gena (Bcl-2, Bcl-X_L) u sarkoidnom granulomu²². Rezultate različitih studija teže je uspoređivati i zbog različitih uzoraka na kojima su studije rađene. Tako je poznato da udio CD4 i CD8 limfocita u krvi inverzno korelira sa udjelom u BAL-u, a makrofagi/monociti prolaze niz maturacijskih koraka pri prolazu kroz zid alveola²⁸.

Apoptoza ima važnu ulogu u smanjivanju celularnosti novonastalog vezivnog tkiva u BOOP-u, a broj apoptotičkih događaja znatno je veći u BOOP-u nego u UIP-u. Neke od apoptotičkih stanica vjerojatno su upalne stanice i upalni infiltrat također može biti ograničavajući za bolest³¹. Ekspresija gena uključenih u apoptozu uglavnom je ispitivana na bronhiolarnim i alveolarnim epitelnim stanicama različitih bolesti plućnog intersticija, poglavito IPF-u i kolageno-vaskularnim, da bi se utvrdila njihova uloga u nastanku plućne fibroze^{31,32,33}.

1.2. DIJAGNOSTIČKE METODE

1.2.1. Bronholaveolarno ispiranje (BAL)

Bronhoalveolarno ispiranje (*engl. bronchoalveolar lavage* - BAL) postupak je koji omogućava dobivanje staničnih i nestaničnih komponenti iz perifernog, bronhoalveolarnog dijela respiratornog sustava. Ispire se određeni segment plućnog parenhima izotoničnom otopinom natrijevog klorida, a dobivena aspirirana tekućina naziva se bronhoalveolarnim ispirom i koristi se u dijagnostici raznolikih plućnih bolesti. Bronhoalveolarni ispirak omogućuje uvid u stanje svih respiratornih jedinica distalno od zaglavlivanja bronhoskopa^{34,35}.

Pretraga se vrši fleksibilnim bronhoskopom tako da se vrh bronhoskopa zaglavi u segmentalni ili subsegmentalni bronh područja koje želimo isprati, potom se određena količina tekućine u 4-5 frakcija instilira kroz radni kanal, te aspirira u odgovarajuću silikoniziranu posudu. Praktički svako područje pluća može se ispirati ovisno o lokalizaciji infiltrata, a u difuznim intersticijskim bolestima to je srednji režanj ili lingula^{34,36}. Prema preporukama Europskog respiratornog društva, za citološku i imunološku analizu trebalo bi instilirati 4x50 ml u srednji režanj ili lingulu³⁶. Sadržaj se aspirira pod negativnim tlakom od 25-100 mmHg, prikuplja se u silikoniziranu staklenu bocu, a uobičajeni volumen aspiriranog sadržaja iznosi oko 50% (+/-10%) instilirane tekućine³⁵.

Dobiveni lavat potrebno je što prije obraditi, jer stanice brzo gubi vijabilnost i uzorak postaje nepodesan za analizu. Ukupan broj stanica u lavatu određuje se hemocitometrom ili brojanjem stanica u Bürker-Tierckovoj komori. Nakon filtriranja i uklanjanja sluzi, tekućina se centrifugira u citocentrifugi 5 minuta na 1000 okretaja/min³⁷. Citološki preparati rutinski se boje May-Grünwald-Giemsa metodom, koja zahtijeva prethodno fiksiranje centrifugata sušenjem na zraku bar 1 sat. Citološka analiza bronhoalveolarnog ispirka sastoji se od pretraživanja na maligne stanice, mikroorganizme, anorganske sastojke i drugi nestanični materijal, te određivanja staničnog sastava. Određivanje staničnog sastava vrši se u dva koraka. U prvom se određuje adekvatnost uzorka, broji se 400 do 600 dobro očuvanih stanica koje se ne preklapaju, a broj pojedinih stanica izražava se u postotku. Ukoliko se nađe više od 5% pojedinačnih stanica bronhalnog epitela i/ili skupine stanica bronhalnog epitela, i/ili primjesa pločastih stanica i/ili veći broj eritrocita, uzorak nije adekvatan^{34,36,38}. Adekvatan uzorak broji se ponovno bez bronhalnih stanica, u broj su uključeni makrofagi, limfociti, neutrofilni i eozinofilni granulociti,

plazma stanice i mastociti, a izražava se u postoku ili kao broj vrste stanica/200 stanica. Ovako određen postotak ili broj pojedinih stanica predstavlja stanični sastav BAL-a³⁸. Bronhoalveolarno ispiranje dokazna je metoda u nekim bolestima plućnog intersticija (tablica 3).

Tablica 3. Dijagnostički citološki nalazi u BAL-u. Preuzeto iz Costabel i sur.³⁹ i modificirano.

Citološki nalaz u brohoalveolarnom ispirku	Citološka dijagnoza
Pneumocystis carinii, gljivice, CMV transformirane stanice	Oportunističke infekcije
Mliječni izgled ispirka, PAS (+) nestanični sadržaj, pjenušavi fagi	Alveolarna proteinoza
Siderofagi, eritrofagi, eritrociti	Sy. alveolarnog krvarenja
Maligne stanice solidnih tumora, limfoma, leukemija	Maligni infiltrati
Ugljena prašina u makrofagima, kvantificiranje azbestnih tjelešaca	Pneumokonioze
Eozinofila > 25%	Eozinofilna plućna bolest
CD1a pozitivnih Langerhansovih stanica > 5%	Histiocitoza X

Za detekciju Pneumocystis jiroveci potrebno je obojiti svježe razmaze brzim bojanjem po Papanicolaou i Kwik-Diffu. Razmaze je moguće i naknadno obojiti Berlinskim modrilom na siderofage i PAS-om ako se sumnja na alveolarnu proteinozu, te po Feulgenu za morfometriju i statičku DNA citometriju. Moguće je pohraniti neobojane razmaze BAL-a za imunocitokemijsku obradu i određivanje subpopulacija limfocita, naročito određivanje omjera CD4 i CD8 pozitivnih limfocita u limfocitnom tipu BAL-a, te određivanje postotka CD1a pozitivnih stanica. Imunocitokemijska obrada pretpostavlja upotrebu običnog svjetlosnog mikroskopa, stalno praćenje reakcije uz izvrsnu morfologiju stanica, te veću osjetljivost nego u protočnom citometru. Omjer CD4 i CD8 pozitivnih limfocita u BAL-u u rutini određuje se najčešće protočnim citometrom obzirom na veći broj stanica u uzorku nego na staklu i jednostavnije izvođenje dvostruko obilježenih proba^{38,39}.

BAL predstavlja važnu pomoć u postavljanju dijagnoze i drugih bolesti plućnog intersticija. U takvim slučajevima, na temelju stanične populacije koja prevladava u lavatu, procjenjujemo radi li se o limfocitnom, neutrofilnom, eozinofilnom ili miješanom alveolitisu. Tipovi alveolitisa važni su u diferencijalnoj dijagnozi. Granične vrijednosti postotaka pojedinih stanica u staničnom sastavu BAL-a prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Normalni postotak pojedinih stanica u citološkom sastavu BAL-a. Modificirano prema Guzman i sur.⁴⁰.

	Makrofagi %	Limfociti %	Neutrofilni gra %	Eozinofilni gra %	Plazma st.	Mastociti %
Nepušači	92±4	7 ± 3 do 15	1 ± 1 do 5	- do 1	-	-
Pušači	96±3	3 ± 2 do 5	1 ± 1 do 5	- do 1	-	-

Uz normalni ili samo lagano povišeni ukupni broj stanica u BAL-u, u sarkoidozi je karakterističan stanični sastav sa predominacijom limfocita, obično normalnim postotkom eozinofila i neutrofila, bez plazma stanica i pjenušavih makrofaga^{40,41}. Limfocitni tip BAL-a nađe se u više od 90% bolesnika sa sarkoidozom. Postotak limfocita mijenja se ovisno o stadiju bolesti, tako je u stadiju 3 samo lagano povišen, ili u granicama normale⁴². Omjer CD4/CD8 pozitivnih T limfocita veći od 3,5 pokazuje 94-96% specifičnost za sarkoidozu, uz nisku osjetljivost od 52-59%^{39,41}.

Što je omjer CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita viši, veća je i njegova specifičnost za dijagnozu sarkoidoze. Pod utjecajem je radiološkog stadija, rase bolesnika, spola i dobi. Nije dokazan utjecaj količine BAL-a na omjer CD4/CD8 T limfocita. Omjer CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita pokazuje visoku varijabilnost, stoga je i njegova dijagnostička vrijednost upitna. U 4-10% slučajeva u sarkoidozi nađe se niski omjer CD4/CD8 T limfocita. CD8 pozitivni T limfociti značajno doprinose upalnom procesu. Ipak, omjer CD4 i CD8 T limfocita od prognostičkog je značenja u plućnoj sarkoidozi i povećani omjer udružen je sa povoljnom prognozom^{39,41,43}.

Izraziti limfocitni alveolitis osim u sarkoidozi, nađe se i u drugim bolestima intersticija koje nisu sarkoidoza: izrazito povišen broj limfocita u hipersenzitivnom pneumonitisu, pneumonitisu izazvanom lijekovima, te nešto manjeg intenziteta u idiopatskoj

plućnoj fibrozi (IPF), bronhiolitis obliteransu s organizirajućom pneumonijom (BOOP), respiratornom bronhiolitisu s intersticijskom pneumonijom (RB-ILD), te plućnim manifestacijama kolageno - vaskularnih bolesti^{3,39,44} (tablica 5). Osim tipa alveolitisa, važan je izgled i pigmentacija makrofaga i nalaz nestaničnih komponenti^{3,38,40}.

Drent i sur. primijetili su da je povećanje broja neutrofilnih granulocita u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom udruženo sa uznapredovalom bolešću. Ovi rezultati ukazuju da su neutrofilni granulociti, a ne limfociti važni u konačnom ishodu bolesnika sa sarkoidozom i evoluciji upalnog procesa prema plućnoj fibrozi⁴⁵. Ozdemir i sur. prikazali su da je koncentracija CD95 Fas apoptotičke molekule značajno viša u bolesnika sa kroničnom sarkoidozom nego u onih sa spontanom remisijom¹⁴. Heron i sur. pokazali su da kombinacija CD103^bCD4^b/ CD4^b omjera (<0.2) uz BAL CD103^bCD4^b/ CD4^b omjer (<0.2) ili relativni BAL/periferna krv CD4^b/ CD8^b omjer (>2) omogućuju razlikovanje sarkoidoze od drugih intersticijskih plućnih bolesti uz osjetljivost od 66% i specifičnost od 89%⁴¹.

1.2.2. Ostale bronhoskopske metode uzimanje uzoraka

Uz bronhoalveolarno ispiranje, neophodno za citološku analizu staničnog sastava i određivanje subpopulacija T limfocita, važno je i uzimanje drugih uzoraka za citološku i/ili histološku analizu. Pri bronhoskopiji je moguće učiniti eksciziju sluznice bronha i transbronhalnu biopsiju pluća⁴⁶. Citološki otisci ovih uzoraka također su važan izvor dijagnostičkih informacija^{19,38,47}. Zajednički konsenzus i izvješće o sarkoidozi Američkog društva za torakalne bolesti (ATS), Europskog društva za respiratorne bolesti (ERS) i Svjetske udruge za sarkoidozu i druge granulomatozne bolesti (WASOG) iz 1999. godine, uzimaju u obzir transbronhalnu biopsiju pluća kao dijagnostičku metodu za morfološki dokaz granuloma². Pri bronhoskopiji – fleksibilnoj i rigidnoj moguće je i punktirati promjene u medijastinumu, prvenstveno limfne čvorove. Najčešće se izvodi transbronhalna/transtrahealna aspiracijska punkcija tankom iglom za citološku analizu^{3,48,49}. Od 116 naših bolesnika sa povećanim limfnim čvorovima medijastinuma, sarkoidoza je ovim putem dijagnosticirana u 88 bolesnika (75,9%), s malim postotkom neadekvatnih uzoraka (8,2%)⁴⁹. Kombinacija transbronhalne/transtrahealne punkcije i transbronhalne biopsije pluća može 25-40% povećati dijagnostički domet ovih pojedinačnih metoda u dijagnostici sarkoidoze⁴⁸.

Tablica 5. Stanični profili BAL-a u čestim bolestima plućnog intersticija
Modificirano i preuzeto iz Peroš-Golubičić⁵⁰.

Bolest	Alveolarni makrofagi	Limfociti	Neutrofili	Eozinofili	Druge stanice	CD4/CD8 omjer
Sarkoidoza		++	-/+	-/+		↓/=↑↑
IPF		+	++	+		=
BOOP	Pjenušavi	+	+	+		↓
NSIP		+	+	+		↓
RB-ILD/DIP	Sadrže cigaretni pigment	=	++	=		=
AIP		=	++	=	Atipični pneumociti tipa II, amorfni materijal	=
Hipersenz. pneumonitis	Pjenušavi	++	+	-/+	Povremeno plazma stanice, mastociti	↓/=
Pneumonitis izazvan lijekovima	Pjenušavi	++	+	+	Povremeno plazma stanice, mastociti	↓/=
Bolest vezivnog tkiva		+	+	=/+		↑/=↓
Eozinofilna pneumonija		+	=	++	Povremeno plazma stanice	↓
Difuzno alveolarno krvarenje	Siderofagi	=/+	+	=/+		=
Alveolarna proteinoza	Pjenušavi	+	=	=		↓
Histiocitoza		=	=	=/+	Langerhansove stanice CD1a i S-100 pozitivne	=

1.2.3. Radiološke pretrage

Razlikujemo pet radioloških stadija sarkoidoze na temelju konvencionalnog radiograma pluća: 0. stadij – uredan radiološki nalaz pluća (ekstratorakalna sarkoidoza), 1. stadij – hilarna i medijastinalna limfadenopatija, 2. stadij – medijastinalna limfadenopatija s promjenama plućnog parenhima, 3. stadij – intersticijske (parenhimske) promjene bez limfadenopatije, 4. stadij – definitivna fibroza. Po učestalosti primarne prezentacije bolesti, stadij 0 nađe se u 5-10 % bolesnika, stadij 1 u 50%, stadij 2 u 25%, stadij 3 u 14% i stadij 4 u 5-10% bolesnika sa sarkoidozom⁵¹. Osim konvencionalnih radiograma, u praćenju, procjeni aktivnosti i dinamike bolesti koristi se kompjuterizirana tomografija visoke rezolucije (HRCT)^{3,21}. U posljednje vrijeme od dijagnostičkog značenja su pozitrona emisijska tomografija (PET) i magnetska rezonanca (MRI) u procjeni zahvaćenosti srca, te genetika⁴¹.

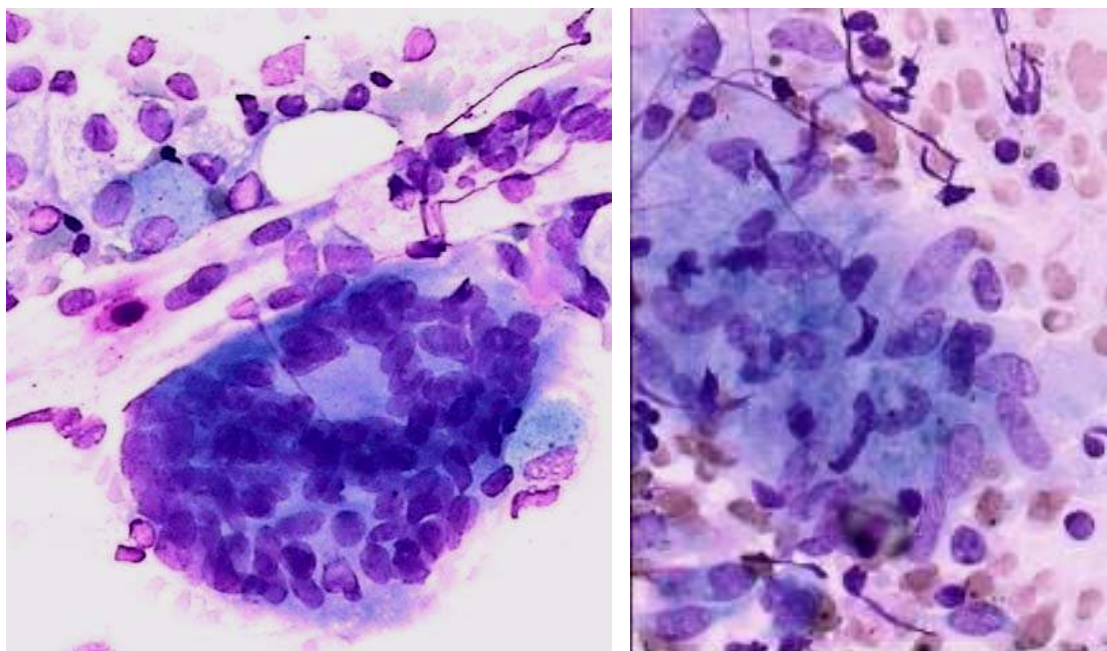
1.2.4. Mikroskopska morfološka dijagnoza sarkoidoze

Za mikroskopsku morfološku dijagnozu sarkoidoze potrebno je dokazati granulome bez kazeozne nekroze, građene od različito brojnih pojedinačnih ili skupina epiteloidnih stanica, multinuklearnih orijaških stanica tipa Langhans, te malih limfocita^{2,3,41}. Orijaške stanice mogu sadržavati citoplazmatske inkluzije kao što su asteroidna tjelešca i Schumannova tjelešca. Centralni dio granuloma obično se sastoji od T limfocita, predominantno CD4 pozitivnih, a CD8 pozitivni limfociti smješteni su na periferiji. Dokaz granuloma može biti patohistološki i/ili citološki (slika 2a i b).

Najčešći, dostupni supstrati za ove analize su: povećani limfni čvor periferno ili medijastinalno, kožne promjene, subkutane promjene, povećane slinovnice te promjene plućnog parenhima.

Prema zajedničkom konsenzusu i izvješću o sarkoidozi ATS/ERS/WASOG iz 1999, patohistološka diferencijalna dijagnoza uključuje različita stanja ovisno o zahvaćenosti pluća ili samo limfnih čvorova. Ako je granulom u limfnim čvorovima, diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze: tuberkuloza, atipična mikobakterioza, gljivične infekcije (kriptokokoza, aspergiloza, histoplazmoza, kokcidioidomikoza, blastomikoza, pneumocystis jiroveci, mikoplazma i dr.), hipersenzitivni pneumonitis, pneumokonioze, reakcije izazvane lijekovima, aspiracija stranih tvari, Wegenerova

granulomatoza, kronične intersticijske pneumonije te nekrotizirajući sarkoidni granulomi.



a)

b)

Slika 2. Citološki otisak transbronhalne biopsije pluća: a) multinuklearna orijaška stanica tipa Langhans, MGG, povećanje 200x; b) skupina epiteloidnih stanica, MGG, povećanje 400x.

Ako je granulom u plućima, diferencijalna dijagnoza uključuje također tuberkulozu i atipične mikobakterioze, gljivične infekcije (bruceloza, toksoplazmoza, bolest mačjeg ogreba, granulomatozni histiocitarni nekrotizirajući limfadenitis – Kikuchijeva bolest), sarkoidnu reakciju na karcinom, Hodgkinov i non-Hodgkinov limfom, te granulomatoznu leziju nepoznatog značenja (GLUS sindrom)^{2,52}. Dijagnoza sarkoidoze pretpostavlja karakterističnu kliničku sliku, nalaz nekazeoznog granuloma i isključenje drugih bolesti sa sličnim morfološkim ili kliničkim značajkama^{1,2,3}.

1.2.4.1. Citološka analiza uzoraka

Zajednički konsenzus i izvješće o sarkoidozi ATS/ERS/WASOG iz 1999. predviđaju samo biopsiju pluća ili drugih patoloških supstrata kao dijagnostičku metodu za morfološki dokaz granuloma². Sve je više dokaza da kombinacija transbronhalne/transtrahealne punkcije i transbronhalne biopsije pluća može povećati dijagnostički domet pojedinačnih metoda u sarkoidozi 25-40%⁴⁸. Transbronhalna/transtrahealna punkcija važna je za dobivanje adekvatnog uzorka u sarkoidozi koja se primarno manifestira povećanim limfnim čvorovima medijastinalno/hilarno^{1,3,19,49}. U 88 naših sarkoidoza, citološki nalaz epitelioidnih stanica uz ostale elemente reaktivne hiperplazije limfnog čvora u transbronhalnom/transtrahealnom punktatu medijastinalnih limfnih čvorova bio je dijagnostički kriterij koji ukazuje na sarkoidozu u 18,2% bolesnika. U 63,6% bolesnika citološka dijagnoza ujedno je bila i jedina morfološka dijagnoza sarkoidoze. Dijagnostička pouzdanost citološkog nalaza transbronhalne punkcije tankom iglom u dijagnozi sarkoidoza bila je 86,2%, nešto viša nego u sličnim objavljenim studijama⁴⁹. U posljednje vrijeme endobronhalna punkcija pod UZV kontrolom pokazuje veći dijagnostički domet i manji rizik od transbronhalne biopsije pluća¹.

Prisutnost male količine nekroze ne isključuje sarkoidozu. Citološkim pregledom i dodatnim pregledima treba isključiti prisutnost acidrezistentnih bacila i gljivičnih elemenata u razmazu i bakteriološkim kulturama^{48,49}.

Otisak transbronhalne biopsije pluća uzorak je u kojem nalazimo citološke elemente i/ili stanični sastav koji može biti dijagnostički ili ukazivati na bolest plućnog intersticija. Otisak transbronhalne biopsije pluća ima dijagnostičku vrijednost u dijagnostici sarkoidoze ako se nađu svi elementi granulomatoze bez nekroze^{38,47}. Elementi granuloma sastavljeni od manjih skupina epitelioidnih stanica, malobrojnije multinuklearne orijaške stanice, neke tipa Langhans, uz pjenušave makrofage i nešto vakuoliziranije reaktivne pneumocite, te male limfocite, mogu odgovarati hipersenzitivnom pneumonitisu. Brojniji reaktivni, izrazitije vakuolizirani pneumociti u skupinama, uz skupine pjenušavih, vakuoliziranih makrofaga, indikativni su za rekaciju izazvanu lijekovima, a ako se nađe skupina kubičnih, atipičnih epitelnih stanica, ne može se isključiti BOOP. Sličan stanični sastav, uz nešto brojnije upalne stanice nađe se u UIP-u i NSIP-u. Brojni pigmentofagi

ispunjeni tamnim grubim pigmentom koji nije hemosiderin, uz ostale elemente koji ukazuju na bolest plućnog intersticija odgovaraju pneumokoniozi^{19,38,47,53}.

Za interpretaciju ovih citoloških slika neophodno je dobro poznavati sve relevantne anamnestičke i kliničke podatke.

1.2.4.2. Patohistološka analiza uzoraka

Za patohistološku analizu koriste se tri vrste biopsije pluća: transbronhalna biopsija (TBB), otvorena biopsija (OBP) i videoasistirana torakoskopska biopsija (VATB). Transbronhalna biopsija pluća preporuča se u većini slučajeva ako se na osnovu kliničkih podataka sumnja na sarkoidozu. Minimalno je invazivna pretraga, a izvodi se pri fleksibilnoj bronhoskopiji. Dijagnostički domet pretrage ovisi uvelike o iskustvu bronhoskopičara i kreće se od 40-90%, ako se uzima 4-5 uzoraka^{2,46}. Osjetljivost endobronhalne biopsije je 40-60% i povećava doprinos transbronhalne biopsije.¹ Često je dijagnostička za bolesti koje imaju specifična histološka obilježja, a raspoređene su peribronhialno, kao što su: sarkoidoza, tumori, infekcije, alveolarna proteinoza, odbacivanja presatka⁴⁶.

Granulomski upalni uzorak s nekrozom ili bez nje može se naći u: sarkoidozi, hipersenzitivnom pneumonitisu, reakciji na lijekove, intravenoznoj talkozi, pneumokoniozama, Sjögrenovu sindromu, te tumorima (osobito limfomima). U sarkoidozi i beriliozi granulomi se nalaze i duž krvnih žila⁴⁶.

Broj i patohistološki izgled granuloma variraju sa radiološkim stadijem i težinom sarkoidoze⁴². Najveći broj granuloma po biopsiji nađen je u bolesnika sa radiološkim stadijem 2 sarkoidoze, veličina i volumen granuloma povećavali su se kontinuirano od stadija 1 do 3, a oblik se mijenjao od iregularnog do sferoidnog⁴². Također, pri rastu granuloma jednakomjerno se povećavaju centralna i rubna područja do stadija 2, kada se povećava samo periferija granuloma uz pojavu fibroze.

Granulomi u hipersenzitivnom pneumonitisu (akutni i subakutni) i reakciji na lijekove obično su mali, ne-konfluiraju i slabije su formirani, nema nekroze i smješteni su bronhocentrično^{46,54,55}. U kroničnoj formi hipersenzitivnog pneumonitisa granulomi su puno rjeđi nalaz⁵⁵. Histološki uzorci u bolestima plućnog intersticija koje nisu sarkoidoza mogu biti raznovrsni. Pojedini uzorci dovoljno su različiti i udruženi sa pojedinim kliničko-radiološko-patološkim dijagnozama idiopatskih intersticijskih pneumonija (tablica 6)^{44,56,57}. Hipersenzitivni pneumonitis, reakcije na lijekove, intravenozna talkoza, pneumokonioze, Sjögrenov sindrom, mogu se prezentirati i granulomskim uzorkom, kao što je prethodno opisano⁴⁶.

Ako je transbronhalna biopsija pluća nedijagnostička, postoje jasne radiološke abnormalnosti parenhima te nema promjena za punkciju ili biopsiju na drugim dostupnim organima i tkivima, može se izvesti otvorena biopsija pluća. U slučaju medijastinalne limfadenopatije, dijagnostičke metode izbora su minimalno invazivna transbronhalna/transtrahealna punkcija tankom iglom, te invazivna medijastinoskopija. Otvorena biopsija ima najveću dijagnostičku vrijednost, ali je i najinvazivnija. Nije preporučljiva za promjene smještene duboko u plućima ili za one smještene oko proksimalnih bronha, za ostale promjene dijagnostička točnost je visoka i iznosi oko 92%. Videoasistirana torakoskopska biopsija (VATB) ima manje komplikacija od otvorene biopsije, ali su uzorci kolabirani i ne može se ispitati dio koji se uzima⁴⁶.

U nekih bolesnika s klinički dokazanom intersticijskom plućnom bolesti nema patoloških promjena u biopsijama. Uzroci mogu biti: loš uzet uzorak, nježni intersticijski infiltrati ili rana faza difuznog alveolarnog oštećenja, bronhiolarna bolest, plućni edem, plućna embolija, limfangioleiomiomatoza s neuočljivim lezijama, te plućna vaskularna bolest⁴⁶.

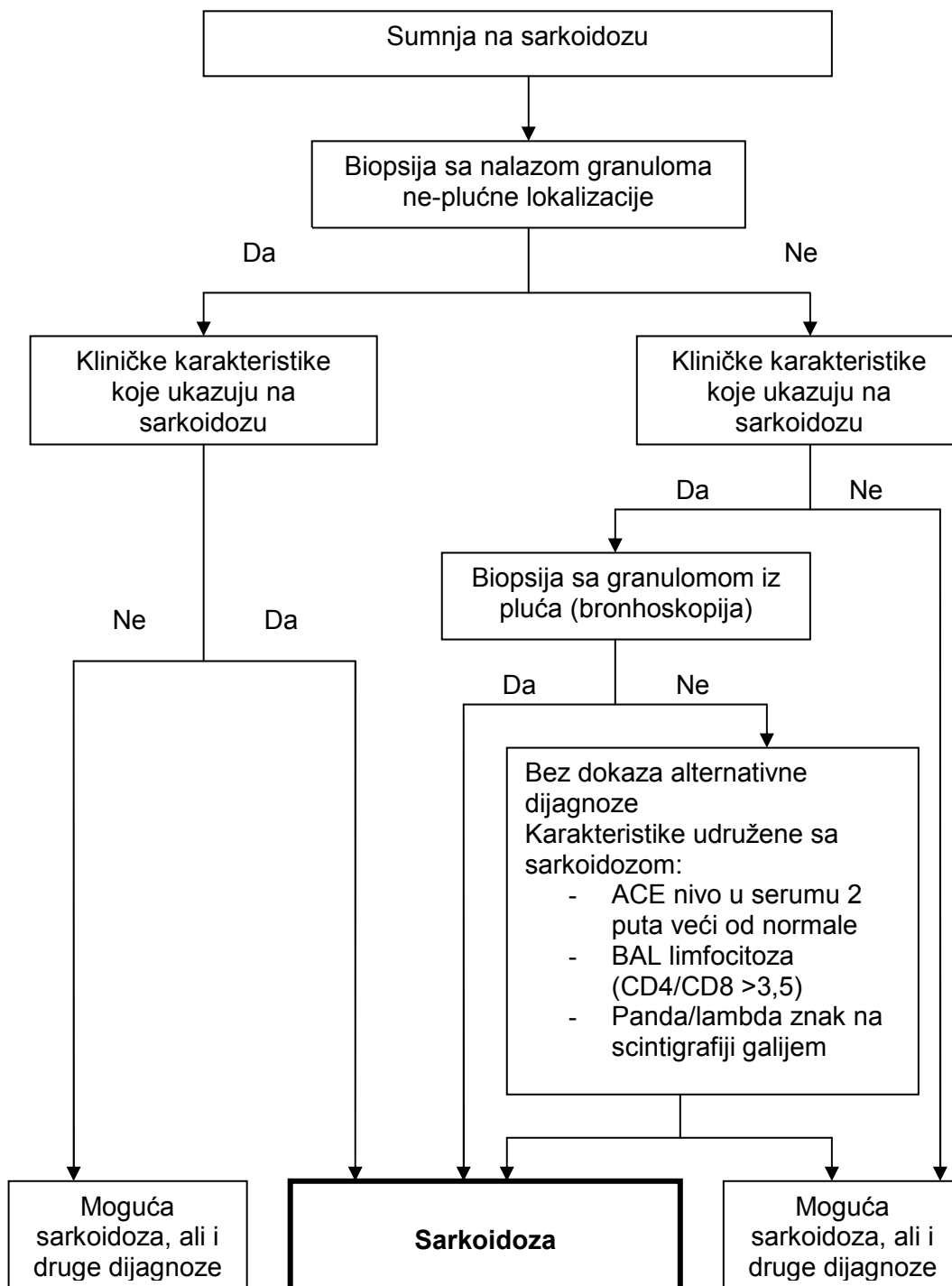
1.2.4.3. Bolesnici bez mikroskopske morfološke dijagnoze

Neki bolesnici odbijaju biopsiju, a u nekih oslabljene plućne funkcije ne dopuštaju invazivniju dijagnostiku. Klinička prezentacija sarkoidoze gotovo je jednako važna kao i patohistološki nalaz^{2,3}.

Slika 3 sažeto prikazuje dijagnostičke puteve do konačne dijagnoze sarkoidoze. Kliničke i radiološke karakteristike mogu biti dijagnostičke u stadiju I (98% pouzdanosti), stadiju II (89% pouzdanosti), ali se dijagnostička pouzdanost znatno smanjuje za bolesnike u stadiju III (52%) ili stadiju IV bolesti (23%). U većini slučajeva od znatne je pomoći bronhoalveolarno ispiranje i određivanje subpopulacija T limfocita. Omjer CD4/CD8 veći od 3,5 omogućuje dijagnozu sarkoidoze sa specifičnošću od 94% i u slučajevima ne-dijagnostičke transbronhalne biopsije pluća^{2,51}.

Tablica 6. Histološka i klinička klasifikacija, te učestalosti idiopatskih intersticijskih pneumonija. Preuzeto iz Peroš-Golubičić T⁴⁴.

Histološki uzorak	Kliničko-radiološka-patološka dijagnoza	Učestalost
Obična intersticijska pneumonija (UIP)	Idiopatska plućna fibroza (IPF/UIP)	55%
Nespecifična intersticijska pneumonija (NSIP)	Nespecifična intersticijska pneumonija (NSIP)	25%
Organizirana pneumonija (OIP)	Kriptogena organizirana pneumonija (COP) ili idiopatski bronhiolitis s organizirajućom pneumonijom (BOOP)	3%
Difuzno alveolarno oštećenje	Akutna intersticijska pneumonija (AIP)	<1%
Respiratorni bronhiolitis (RB) i deskvamativna intersticijska pneumonija (DIP)	Respiratorni bronhiolitis s intersticijskom pneumonijom (RB-ILD) i deskvamativna intersticijska pneumonija (DIP)	15%
Limfoidna intersticijska pneumonija (LIP)	Limfoidna intersticijska pneumonija (LIP)	<1%



Slika 3. Predloženi algoritam za dokazivanje sarkoidoze. Dio bolesnika nema morfološku potvrdu, već kliničke karakteristike udružene sa sarkoidozom. Preuzeto iz Peroš-Golubičić³ i modificirano.

1.3. PLUĆNI MAKROFAGI

1.3.1. Vrste i uloga makrofaga

Makrofagi su najbrojnija stanična populacija mnonuklearno-fagocitnog sistema i prisutni su u svakom organu i tkivu. Razlikuju se morfološki, biokemijski i funkcionalno od prekursora u cirkulaciji, monocita, međusobno se razlikuju obzirom na tkivo porijekla, te unutar istih tkiva^{58,59}.

U plućima razlikujemo 4 tipa makrofaga na osnovu njihove lokalizacije, a raspoređeni u dva glavna odjeljka – alveolarni i intersticijski⁶⁰. Tipovi plućnih makrofaga obzirom na lokalizaciju su: alveolarni makrofagi, intersticijski makrofagi, intravaskularni makrofagi i dendritičke stanice. Alveolarni makrofagi smješteni su unutar fosfolipidno-proteinskog surfaktantnog filma, jedini su makrofagi u tijelu izloženi zraku, sa visokim fagocitnim i mikrobicidnim potencijalom, te predstavljaju prvu obrambenu liniju protiv inhaliranih tvari⁶⁰. Predstavljaju više od 90% stanica koje se mogu naći u BAL-u. Dendritičke stanice ne moraju biti obavezno makrofagnog porijekla, a nađu se u intersticijskom tkivu pluća u malom broju. Odlikuju se niskom ili odsutnom fagocitnom aktivnosti, a specijalizirani su za antigenu prezentaciju što se vidi po izraženoj ekspresiji antigena HLA razreda II i odsutnošću Fc- γ receptora na površini. Intravaskularni makrofagi locirani su na endotelnim stanicama kapilara. Posjeduju visoku fagocitnu sposobnost za razliku od monocita⁶⁰. Lokalna proliferacija makrofagnog sistema može biti u alveolama i u intersticiju pluća.

Makrofagi posjeduju brojne membranske receptore, među njima za fagocitozu najvažniji su Fc receptori, receptori komplementa i lektinski receptori. Važni su i receptori za makrofag-aktivirajuće citokine kao što su IL-1 i TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, faktore rasta CSF-1, GM-CSF, TGF- β . Uz receptore, važnu ulogu na makrofagima imaju i površinski markeri kao što su transferinski receptor CD71, membranski glikoproteini porodice integrina- β . Molekule udružene sa adhezijom CD11a, CD11b i CD11c nađu se na alveolarnim makrofagima u različitim postocima, CD11a i CD11c na više od 90% makrofaga za razliku od samo 50% CD11b u normalnim uvjetima, ali u 80% u bolesnika sa aktivnom sarkoidozom uz korelaciju sa intenzitetom limfocitnog alveolitisa u BAL-u^{3,60}. CD18 koji predstavlja β -lanac CD11 grupe nađe se u 88% makrofaga. Intracelularna adhezijska molekula-1 (ICAM-1, CD54) nađe se u samo 39% inaktivnih alveolarnih makrofaga u BAL-u za

razliku od 84% uz limfocitni alveolitis u sarkoidozi. Primijećeno je također da je ekspresija HLA klase II na makrofagima pod utjecajem limfocita BAL-a i citokina. Alveolarni makrofagi oslobađaju IL-1, IL-6, TNF, TGF- β , FGF, faktore kemotaksije, PDGF i CSFs. Citokinska produkcija uvelike ovisi o stimulusu, najčešće se radi o bakterijskim lipopolisaharidima i virusima. Alveolarni makrofagi posjeduju snažni mikrobicidni i fagocitni potencijal. Njihova efikasnost također ovisi o količini mikroorganizama, ako je broj mikroorganizama npr. veći od 10^6 , makrofagi oslobađaju kemotaktične tvari za polimorfonukleare, a u slučajevima s brojem mikroorganizma većim od 10^8 , dolazi do aktivacije i T i B limfocita.

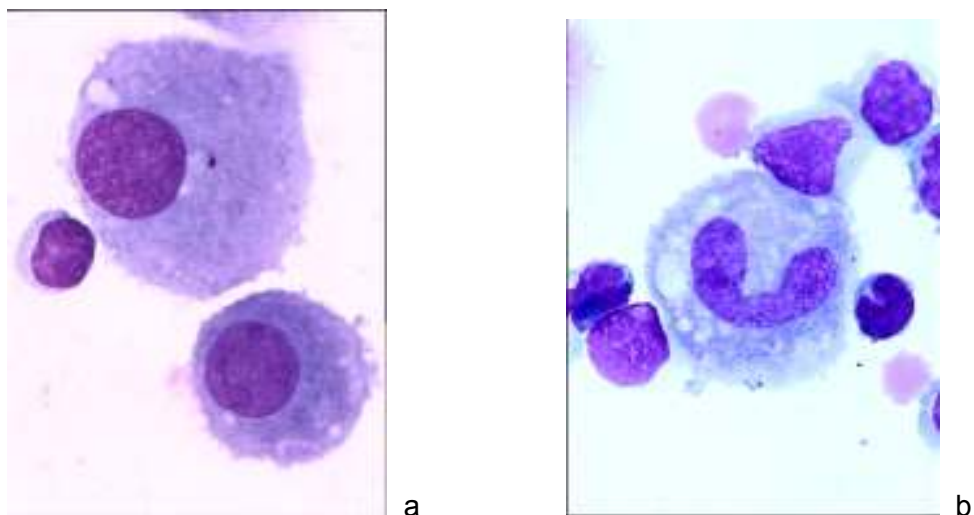
Morfološki, alveolarni makrofagi opisani su kao velike, zrele stanice koje slične tkivnim makrofagima. Intersticijski makrofagi su manji i sličniji monocitima periferne krvi. Obje populacije produciraju fibrinogene molekule i makrofagno su aktivne putem Fc-receptor ovisnog sistema. Alveolarni makrofagi efikasniji su u Fc-receptor nezavisnoj fagocitozi, produkciji citokina uključenih u antimikrobnu obranu, kao što su TNF- α , interferon, kisikovi radikali i nitratni oksidi, a intersticijski makrofagi efikasniji su u sekreciji IL-6, IL-1 i pokazuju višu ekspresiju HLA razreda II, odnosno izraženiju imunoregulatornu funkciju⁶⁰. Dendritičke stanice posjeduju isključivo imunoregulatorna i stimulirajuća svojstva.

Pretpostavljeno je da su alveolarni makrofagi u sarkoidozu aktivirani in-situ, jer in-vitro proizvode velike količine TNF- α i IL-1, a ovi citokini reguliraju produkciju GM-CSF i CSF-1 koji su povišeni u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom. Studija Kaysera i sur. pokazala je da makrofagi koji se nađu u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom dijelom potiču iz sarkoidnih granuloma, i to u jednakom postotoku, neovisno o starosti granuloma i stadiju bolesti⁴².

1.3.2. Morfologija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku (BAL-u)

Makrofagi u BAL-u dobar su predstavnik makrofagne populacije pluća i pokazuju znatne varijacije u ekspresiji površinskih antigena i sekreciji citokina. Subpopulacije makrofaga koje se mogu naći u BAL-u razlikuju se i u različitim upalnim bolestima pluća, od bronhalne astme, sarkoidoze, hipersenzitivnog pneumonitisa do idipatske plućne fibroze.

Rutinskim citološkim pregledom svjetlosnim mikroskopom makrofagi u citocentrifugatima BAL-a ne variraju značajnije veličinom, obzirom da se uglavnom radi o alveolarnim makrofagima (slika 4a).



Slika 4. a. Makrofagi u citocentrifugatu BAL-a. MGG, originalno povećanje 1000x
b. Epiteloidna stanica u citocentrifugatu BAL-a.. MGG, originalno povećanje 1000x

Citoplazme su rijetko izrazito vakuolizirane, osim u hipersenzitivnom pneumonitisu i pneumonitisu izazvanom lijekovima.

Jezgre makrofaga različitog su oblika i veličine, od okruglastih do ovalnih, udubljenih i izduženih, rjeđe se nađu i multinuklearne orijaške forme³⁹. U BAL-u bolesnika sa sarkoidozom mogu se naći multinuklearne orijaške stanice tipa Langhans, koje se razlikuju od multinuklearnih orijaških faga po karakterističnim izduženim jezgrama, citoplazma je jednolično bazofilna, bez vidljivog pigmenta. U BAL-u bolesnika sa sarkoidozom mogu se naći i pojedinačne epiteloidne stanice, kao znak aktivnosti bolesti^{10,34} (slika 4b).

Multinuklearne orijaške stanice tipa Langhans i epiteloidne stanice dio su relativno čvrstog granuloma i u BAL-u ih ne očekujemo u većem broju. Jezgre epiteloidnih stanica izdužene su do udubljene, kromatin je fin, sa kromocentrima na oba ruba. Citoplazme ovih stanica obično su neoštro ograničene i ponekad ih je teško razlikovati od makrofaga, a potrebno je analizirati veći broj stanica, tako da se nalaz malobrojnih epiteloidnih stanica često ne iskazuje pri rutinskoj analizi.

Ultrastrukturalno makrofagi u sarkoidozi značajnije se razlikuju od makrofaga zdravih. Danel i sur. su još 1983. ustanovili da su makrofagi u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom veći od makrofaga u kontrolnih ispitanika, ultrastrukturalno jezgre

sadrže više heterokromatina, u citoplazmi su lizosomi brojniji i veći, a pseudopodiji su bolje razvijeni⁶¹.

Krombach i sur. identificirali su, izmjerili i izbrojili monocitima slične stanice u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom u protočnom citometru⁶². Pretpostavili su da veliki broj monocita ulazi u bronhoalveolarni prostor u toku kroničnih upalnih plućnih bolesti, a povećani broj monocitima sličnih stanica udružen je sa smanjenim plućnim funkcijama.

Najnovija studija Burkhardt-a i sur. razlikuje 3 vrste makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom obzirom na ultrastrukturalne karakteristike citoplazmi. Tip I alveolarnih makrofaga sastoji se od tipičnih makrofaga svih stupnjeva zrelosti. Manji, nezreliji sadrže malo organela, vakuola ili inkluzija, jezgra je udubljena, a mali je broj izdanaka na površini. Što je makrofag bolje diferenciran, povećava se broj izdanaka, inkluzija i organela. Tip II makrofaga je veći, vakuole su brojne, velike, daju sačasti izgled citoplazmi na malom elektronsko-mikroskopskom povećanju. Gustoća vakuola varira, mogu biti prazne, ili ispunjene mijelinskim figurama. Organele su nejednoliko raspoređene. Jezgra je pretežno ovalna, smještena periferno, jezgrica je dobro razvijena, a površina makrofaga neravna. Treći tip makrofaga je također veći, tipičan za sarkoidozu, a obilježavaju ga različite inkluzije. Neke inkluzije su homogene, guste, velike, druge se ne razlikuju značajnije veličinom, ali se odlikuju kružnim gušćim dijelovima na periferiji, treće su male i izuzetno guste, a četvrte su mješavina prva tri tipa. Jezgra je potisnuta na periferiju, mjestimično sa dubokim usjecima i gušćim heterokromatinom. Tip I i II zastupljeni su po 30%, a tip III čini 40% makrofaga BAL-a u sarkoidozi. Povećani broj denznih inkluzija i mijelinu sličnih figura koje se nađu u makrofagima grupa II i III, te gusti heterokromatin grupe III povezuju se sa povećanom metaboličkom aktivnošću i oslobađanjem citokina⁶³.

1.4. MORFOMETRIJA I STATIČKA DNA CITOMETRIJA

1.4.1. Morfometrija

Rutinska citološka procjena veličine stanice temelji se na objektivizaciji subjektivnih, iskustvenih kriterija. Morfometrija je morfološka metoda koja omogućuje numeričku objektivizaciju, a kvantitativni parametri objektivni su i reproducibilni, jeftina je i tehnički jednostavna^{64,65}. Sama riječ morfometrija označava „mjerenje oblika“ (*grčka riječ μορφοσ, oblik*), a metoda obuhvaća kvantitativni opis

geometrijskih struktura u svim dimenzijama^{66,67}. U tablici 7 vidljiv je cijeli niz objektivnih parametara koji mogu izmjeriti i egzaktno opisati strukture prepoznatljive pri subjektivnoj citološkoj procjeni⁶⁶.

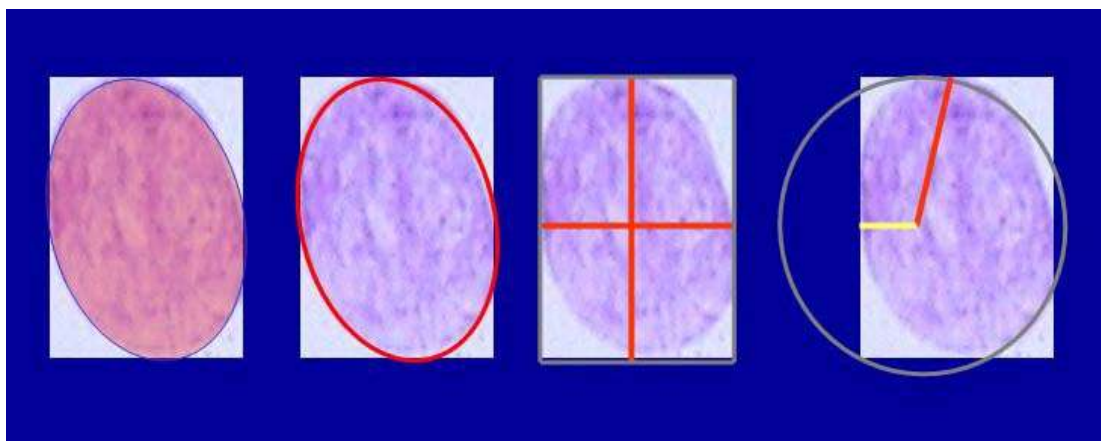
Tablica 7. Subjektivni citološki kriteriji koje se može kvantificirati. Preuzeto iz Van Diest i sur⁶⁶.

Subjektivni kriteriji	Objektivni kvantitativni parametri
Povećane stanice, jezgre	Povećana površina stanice, jezgre
Anizokarioza	Povećana standardna devijacija površine jezgre
Pleomorfizam	Promijenjeni faktori oblika
Promijenjen odnos jezgra/citoplazma	Promijenjena površina jezgra/citoplazma
Promijenjen izgled komatina	Promijenjeni parametri teksture jezgre
Smanjena stanična kohezija	Mala veličina skupina, nekoliko elemenata po skupini

Morfometrijska mjerenja opisuju dvodimenzionalne slike, tako da se često koristi i pojam planimetrija. Stanice koje mjerimo u citološkim i histološkim preparatima pod manjim povećanjima imaju dvodimenzionalni izgled, iako se radi o trodimenzionalnim strukturama. Ova trodimenzionalnost uočljivija je pod većim povećanjima, ali je zanemariva ako se mjere površine jezgara i citoplazmi. Uz opseg i površinu često se mjeri i struktura objekata, stoga je pojam morfometrija u široj uporabi⁶⁶.

Planimetrijski morfološki parametri mogu se podijeliti na:

1. Jednostavne parametre: površina, opseg, promjeri, polumjer, najduža i najkraća os objekta (slika 5).
2. Faktore oblika i izduženosti: mjere (ne)pravilnosti objekta, odnosno nedimenzionalne parametre.
3. Dvofazne parametre: odnos jezgre i citoplazme, odnos jezgrice i jezgre, razlika površina.
4. Kontekstualne parametre: površina skupine, oblik skupine, udaljenost među skupinama.



a) b) c) d)

Slika 5. Jednostavni morfometrijski parametri objekta: a) površina, b) opseg, c) duljina i debljina, d) najmanji i najveći polumjer.

Faktor oblika (engl. *form factor*, *FF*) parametar je koji mjeri stupanj zaokruženosti pojedinačnog objekta^{68,69}. Izračunava se: $4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2$. Ima vrijednost 1 za krug, <1 za elipse, i $\ll 1$ za jako nepravilne oblike (nepravilni rubovi ili varijabilnost oblika). Parametar za objekte koji nisu krug je i faktor izduženosti (engl. *aspect ratio*), koji opisuje odnos duljine i debljine objekta (duljina/debljina)^{66,70,71}.

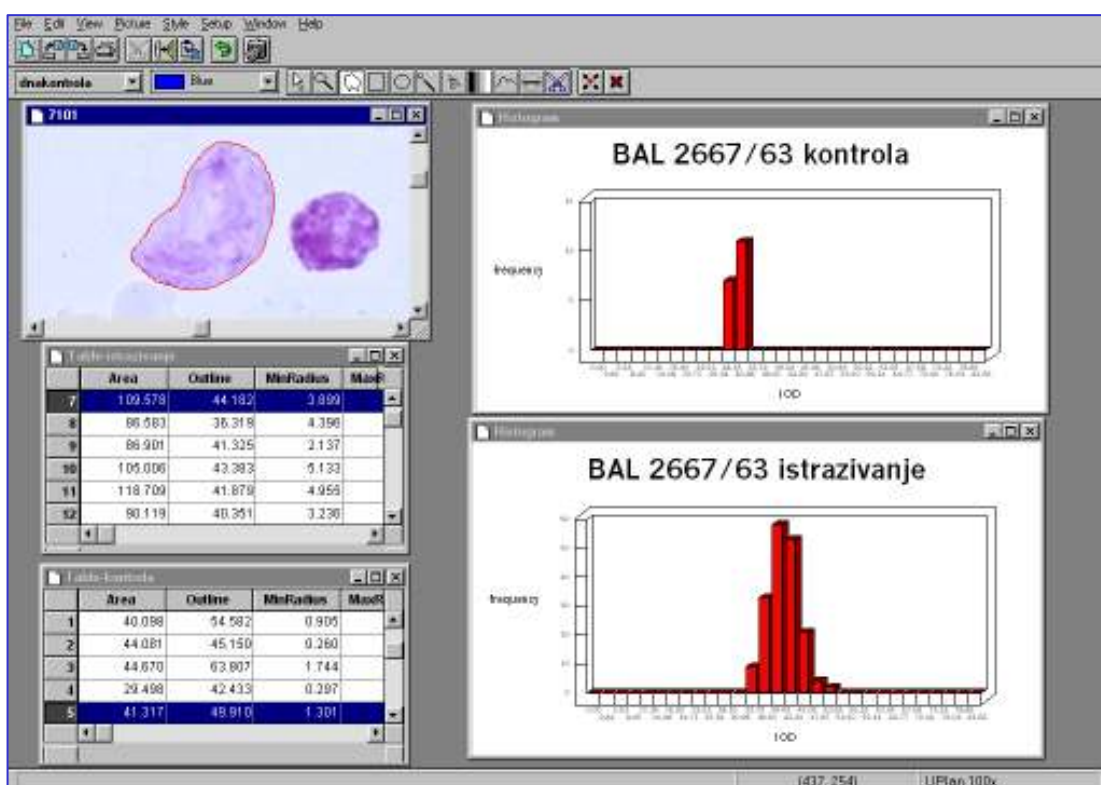
Konvesna površina ili konveksnost (engl. *convex area*, *ConvA*) definirana je kao površina mnogokutnika opisanog na ispitivanom obliku tangentama na njegovim stranama^{70,71}. Ova površina je veća od standardne površine ako jezgra ima nabranu membranu ili uleknuća (indentacija). Faktor sličan stupnju ispunjenosti (engl. *fullness ratio*)⁷¹ je i omjer površine i konveksne površine (engl. *area/conv area*, *ACA*).

1.4.2. Statička DNA citometrija

Većina stanica u tkivima nalazi se u fazi mirovanja (G_0) ili presintetskoj fazi (G_1). Normalno stanice u G_0/G_1 imaju diploidnu ($2N$) količinu DNA. Stanice iz G_1 faze prelaze u sintetsku (S) fazu, kada dolazi do replikacije intracelularne DNA. Tijekom S faze stanice sadrže količinu DNA između $2N$ i $4N$ ^{72,73}. Nakon DNA replikacije stanice ulaze u G_2 fazu s $4N$ količinom DNA. Vrlo brzo stanice iz G_2 faze podliježu mitozu (M). Rezultat mitoze su dvije stanice s diploidnom količinom DNA koje ponovno prelaze ili u G_1 fazu ili u stanje mirovanja G_0 fazu^{72,74}. U tipičnoj staničnoj populaciji normalnih ljudskih tkiva, 95-98% stanica je u G_0/G_1 fazi staničnog ciklusa, 1-5% u S-fazi, i 2-5% u G_2/M fazi staničnog ciklusa⁷⁴.

DNA statička citometrija razvila se 80-tih, potaknuta napretkom računalne tehnike i razvojem programa za digitalnu računalnu analizu⁷⁵. DNA sadržaj jezgre stanice ne može se direktno izmjeriti statičkom citometrijom. Nakon kvantitativnog DNA bojanja određuje se integrirana optička gustoća jezgara (engl. *Integrated Optical Density, IOD*), koja predstavlja citometrijski ekvivalent sadržaja DNA ispitivanih jezgara^{76,77}. Do integrirane optičke gustoće dolazimo nakon određivanja prosječnog nivoa sivila^{66,70, 71,78}, a ovisi o alkalnosti jezgre, odnosno indirektno o količini i rasporedu DNA sadržaja⁷¹.

Europsko udruženje za analitičku celularnu patologiju objavilo je 1995. "Konsenzus o DNA statičkoj citometriji" s nadopunama 1997. i 2001. zbog nemogućnosti usporedbe različitih studija, kao posljedica postojanja najrazličitijih protokola bojenja i mjerenja sadržaja DNA^{76,77,79,80}. Za kvantifikaciju DNA jezgara potrebno je usporediti vrijednosti IOD ispitivanih sa IOD vrijednostima jezgara stanica poznatog DNA sadržaja, koje nazivamo referentne stanice (slika 6). Kao referentne stanice najčešće koristimo neutrofilne granulocite i limfocite.



Slika 6. Prikaz sučelja programa za morfometrijsku i citometrijsku DNA analizu jezgara makrofaga. Istovremeno su prikazane obilježene jezgre ispitivanih i kontrolnih stanica, tablični prikaz izmjerenih vrijednosti, te dobiveni histogrami IOD vrijednosti ispitivanih i kontrolnih stanica.

Da bi se utvrdila točnost mjerenja DNA obavezno je izračunavanje koeficijenta varijacije (CV) referentnih stanica koji u nizu mjerenja mora biti manji od 5%:

$cv = SD/prosjek \times 100$, gdje je prosjek IOD vrijednosti referentnih stanica, a SD standardna devijacija istih vrijednosti.

Da bi se histogram mogao interpretirati, potrebno je odrediti parametre histograma: širina klase, vrh i modalna vrijednost vrha.

Širina klase DNA histograma je $2 \times SD$ (standardna devijacija) vrijednosti IOD G₀/1 faze referentnih stanica. Vrh DNA histograma statistički je značajni lokalni maksimum u DNA histogramu. Modalna vrijednost vrha DNA histograma najčešća je vrijednost vrha, tj. srednja vrijednost one klase histograma koja sadrži najveći broj jezgara. Dobiveni se histogram vrijednosti DNA izražava u „c“ skali gdje je $2c$ (2N) srednji DNA sadržaj stanica normalne, diploidne (ne-patološke) populacije u G₀/G₁ fazi staničnog ciklusa⁸¹. Stanice koje su u S-fazi staničnog ciklusa sintetiziraju DNA, te se njihov sadržaj povećava sve do vrijednosti koja odgovara 2N do 4N, a stanice G₂/M imaju tetraploidnu vrijednost, 4N. Ako je G₀/G₁ vrh istraživanih stanica na istoj poziciji kao G₀/G₁ vrh referentnih stanica, količina DNA se klasificira kao diploidija, a ako je G₀/G₁ vrh ispitivanih stanica različit od G₀/G₁ vrha referentnih stanica, radi se o aneuploidiji. O hipodiploidiji se radi ako je G₀/G₁ vrh manji od referentnih stanica, hiperdiploidiji ako je G₀/G₁ vrh ispitivanih stanica veći od referentnih stanica, a ako se vrh nalazi u tetraploidnoj regiji, količina DNA se klasificira kao tetraploidija.

DNA indeks (DI) predstavlja odnos između vrijednosti G₀/G₁ vrha ispitivanih stanica i vrijednosti G₀/G₁ vrha normalne diploidne populacije. Auer i sur. smatraju diploidnim tumorima one čiji DI iznosi 0.95-1.05⁸². Smets, i sur. međutim, kao hiperdiploidiju uzimaju DNA indeks ≥ 1.16 ⁸³, a VanVelthoven i sur. za granice diploidnog uzimaju $0.9 < DI < 1.15$ ⁸⁴, dok Fausel i sur. ne-diploidnim tumorima smatraju one sa $DI > 1.1$ ⁸⁵.

Dijagnostičku DNA citometriju koristimo uglavnom za identifikaciju staničnih populacija izvan euploidnih raspona, određivanje frakcija stanica u pojedinim fazama ciklusa, ali i za pronalaženje rijetkih stanica s abnormalno visokim sadržajem DNA⁷⁷.

Priprema uzoraka za morfometriju i DNA citometriju – bojanje po Feulgenu

Za klasičnu morfometriju mogu se upotrijebiti preparati rutinski obojeni po MGG-u ili drugim standardnim bojenjima. Za DNA citometriju jezgara potrebno je preparate obojiti po Feulgenu. Tako obojeni preparati mogu se koristiti i za morfometrijska mjerenja jezgara ispitivanih stanica. Koriste se svježe pripremljeni, ali i arhivski preparati stari do 20 godina, koji se odbojaju^{86,87}. Nakon odbojavanja metanolom preparati se refiksiraju u formaldehidu, što je i najčešći način fiksacije⁸⁸. Za preparate sušene na zraku, za fiksaciju se još preporuča i mješavina metanola, formalina i HCl-a .

Metoda specifičnog bojanja tzv. Feulgenova reakcija, koju su uveli Feulgen i Rossenbeck 1924. god. i danas služi kao standard za druge metode⁸⁸. Temelji se na svojstvu DNA da poslije blage hidrolize kloridnom kiselinom (koja uklanja purinske baze), oslobađa aldehidne skupine iz deoksiriboze, na koje se u drugoj fazi reakcije veže fuksin sulfuroična kiselina iz Schiffovog reagensa^{80,88,89}. Bezbojni Schiff-ov reagens pretvara se u svoj obojeni oblik i kovalentno veže za DNA. Do kraja 1940-ih postala je jedna od najistraživanijih kemijskih reakcija za kvantifikaciju intracelularne DNA. U dobro kontroliranim uvjetima specifična je za DNA, jer se u jezgri ne stvaraju dodatne aldehidne grupe⁸⁸.

Feulgenova reakcija omogućila je utvrđivanje:

1. postojanja proporcionalnog odnosa između DNA sadržaja jezgre i kromosomskog broja,
2. DNA sadržaj je isti u svim jezgrama stanica istog organizma,
3. stanice udvostručuju DNA sadržaj prije mitoze.

Feulgenova reakcija također omogućuje usporedbu DNA jezgre različitih biljnih i životinjskih vrsta. Ova metoda omogućuje in-situ specifično bojanje DNA jezgre, boja se veže stehiometrijski za DNA, a količina vezane boje je proporcionalna količini DNA u jezgri⁸⁸. Stoga je glavna aplikacije ove metode uglavnom ograničena na kvantifikaciju DNA u jezgrama pomoću statičke image citometrije.

Zbog različitih rezultata pri korištenju vanjskih standarda preporučuju se interni - unutarnji, kao što su leukociti, jer podliježu istim utjecajima u preparatu kao i analizirane stanice⁹⁰. Za histološke preparate se najčešće koriste stromalne stanice dok su to u citološkim preparatima limfociti i granulociti. Zbog svog gustog, kompaktnog kromatina limfociti primaju i do 10-15% Feulgenove boje manje nego druge stanice, npr. fibroblasti pa su Babiarz i sur. izračunali i faktor korekcije od 10.5%, uspoređujući fibroblaste i limfocite⁷⁸.

Rezultati mjerenja DNA u tumorskim stanicama izražavaju se kao relativne vrijednosti u odnosu na vrijednost interne kontrole (sa definiranom vrijednosti 2N), što nam omogućava određivanje nivoa ploidijske na starim preparatima jednako efikasno kao i na novim.

Računalni sistem za slikovnu analizu

Sistem za slikovnu analizu sastoji se od mikroskopa, kamere visoke rezolucije, kolor monitora, računala i podržavajućeg programa za prihvatanje i analizu slike. Slika iz svjetlosnog mikroskopa pretvara se u analogni električni signal pomoću video ili digitalne kamere. Signal se nakon toga digitalizira u računalu u elemente slike (engl. *pixels*). Tamo gdje ljudsko oko može razlučiti 30-40 zona sivila, računalo može razlučiti 256 zona po svakom elementu slike^{74,89}.

Za ovu vrstu analize mogu se koristiti svi tipovi citoloških uzoraka (izljevi, ispirci, brisevi, punktati) kao i stanične kulture. Svježi uzorci mogu se koristiti za otiske ili pak suspenzije stanica koji se obrađuju kao razmazi ili u citocentrifugi.

1.4.3. Značenje morfometrijske i DNA analize

Brojne su poteškoće u razumijevanju biološkog značenja objektivnih parametara primijenjenih na citološki pregled. Veličina, oblik i količina kromatina utječu na izgled i distribuciju kromatina na malignim stanicama. Distribucija kromatina mijenja i oblik stanice ovisno o povećanju sadržaja kromatina u staničnom ciklusu⁷⁰. Određivanje DNA citometrijskih karakteristika uglavnom je rezervirano za maligne stanice^{66,70,71,91,92,93,94,95,96,97}. Općenito, tumorske stanice i stanice koje se brže dijele imaju kraći stanični ciklus nego normalne stanice, nalaz koji je često od prognostičke važnosti. Skraćivanje staničnog ciklusa se reflektira povećanjem S/G₂M faze ili samo frakcije S faze⁹⁸.

Murata i sur. primijenili su morfometriju sa faktor analizom na jezgrama tumorskih stanica štitnjače. Faktor analiza klasificirala je morfološke karakteristike jezgre kao posebne izdvojene varijable u pet parametara sastavljenih od jezgrine veličine, oblika, heterogenosti, kontrasta i homogenosti izgleda kromatina⁷⁰. Korišteni su jednostavni parametri kao površina, opseg, duljina, debljina, konveksnost; složeni parametri: među njima faktor oblika (FF) i faktor izduženosti, parametri koji opisuju teksturu jezgre i to statistički pokazatelji nivoa sivila: koeficijent varijacija, varijance, entropija, korelacija, angularni moment i dr. Na taj

način bilo je moguće odvojiti benigne jezgre, te jezgre papilarnog i folikularnog karcinoma⁷⁰. Rajesh je našao statistički značajne razlike u morfometrijskim parametrima površina, konveksnost, opseg, duljina, debljina i zaokruženost (slično FF) jezgara između folikularne hiperplazije i folikularnog adenoma štitnjače, dok je zabilježio znatna preklapanja u parametrima između folikularnog adenoma, folikularnog karcinoma i papilarnog karcinoma štitnjače⁹². Rajesh je ispitivao i morfometrijske razlike blasta ALL-L2 i AML-M1 i M2, primjenom parametara: površina, opseg, duljina, debljina, konveksnost i opseg konveksnosti, okruglost, ukupna i prosječna optička gustoća, varianca vrijednosti nivoa sivila, na bar 100 MGG obojenih stanica. Nađena je razlika među blastima AML-M2 i ALL-L2 u prosječnoj optičkoj gustoći⁹⁴. Dalje, Rajesh nije našao razlike u površini, konveksnosti, opsegu, duljini i zaokruženosti između benignih i graničnih lezija dojke⁹⁵. Dey je našao da se prosječna površina i standardna devijacija površina jezgre, opsega, konveksnosti i opsega konveksnosti statistički značajno povećavaju od benignih lezija dojke i karcinoma dojke gradusa I, te gradusa I i II karcinoma dojke na citološkim punktatima dojke⁹⁶. Namyslowski je pokazao vrijednost sličnih parametara: površina, opseg, duljina, debljina, nivoi sivila, konveksnost i opseg konveksnosti, faktor oblika i faktor izduženosti u razlikovanju keratoze, displazije i karcinoma pločastih stanica larinksa⁷¹. Brahmi je ispitivao karakteristike tumora malih okruglih stanica u punktatima tankom iglom pomoću automatizirane morfometrije jezgara pomoću površine, opsega, duljine i zaokruženosti, te je pokazao korisnost u diferenciranju pojedinih tumora⁹³. Kardum je našla analizom DNA sadržaja stanica kronične limfoproliferativne bolesti da su nisko proliferativne stanice one koje imaju većinu stanica u vrhu DNA histograma, a visoko proliferativne one od kojih većina sadrži količinu DNA veću od stanica u vrhu, ili ih je veći broj u S-fazi staničnog ciklusa. Određene su granične vrijednosti za morfometrijske parametre: površina, opseg, konveksitet, duljina, debljina, najveći i najmanji polumjer, faktor oblika i faktor izduženosti koji su udruženi sa boljim preživljenjem. Prognostički dobri parametri su veći postotak stanica u vrhu DNA histograma te veći postotak stanica s manjim sadržajem DNA od stanica u vrhu, a lošiji veći postotak stanica s većim sadržajem DNA od stanica u vrhu histograma, stanice s patološkim mitozama (većim sadržajem DNA od 4N) te više stanica u S-fazi staničnog ciklusa⁷⁸.

Niz ne-malignih i potencijalno malignih promjena posjeduje visoki proliferativni potencijal, kao što su fibrocistične promjene dojke i kronični gastritis. Enchev i sur. proučavali su DNA sadržaj i morfometrijske karakteristike normalnih, hiperplastičnih, premalignih i malignih uzoraka dojke i gastričnih promjena na

citološkim preparatima bojanim hemalaun-eozinom i po Feulgenu⁹⁹. Normalne stanice pokazale su unimodalnu distribuciju DNA sadržaja jezgara u diploidno-tetraploidnoj regiji što objašnjavaju visokom proliferativnom aktivnošću epitela dojke i gastričnog epitela. Hiperplastični procesi, s druge strane, pokazali su polimorfnu distribuciju s nekoliko aneuplodnih vrijednosti što se može objasniti rizikom maligne promjene⁹⁹. Gockal i sur. našli su statistički značajno češću aneuploidiju u bolesnika sa ahalazijom jednjaka koju pripisuju specifičnim kromosomskim prekanceroznim promjenama u trećine bolesnika bez patohistološke displazije. Preporučuju statičku DNA citometriju za ranu dijagnostiku karcinoma u ovakvih bolesnika¹⁰⁰.

Pektas i sur. našli su statistički značajne razlike za površinu, opseg, duljinu, gustoću, DNA sadržaj i DI za maligne i ne-maligne lezije u odnosu na kontrolu⁹⁷.

Malobrojne su morfometrijske i analize DNA sadržaja epiteloidnih stanica u granulomima, uglavnom u limfnim čvorovima. Tosi i sur. uspoređivali su morfometrijske karakteristike jezgara epiteloidnih stanica u histološkim rezovima nekazeoznih granuloma bolesnika sa sarkoidozom i tuberkulozom¹⁰¹. Epiteloidne stanice u sarkoidozi manjeg su opsega, površine i dužeg promjera, oblik je zdepastiji i više eliptičan. Jezgre epiteloidnih stanica u tuberkulozi naglašenije su izdužene i nepravilnije. Razlike u obliku jezgara u njihovom radu (povšina, opseg, duljina, faktor oblika) najbolje je iskazao faktor obilka (FF), složeni parametar za mjeru nepravilnosti objekta. Prosječne vrijednost faktora oblika statistički značajno su se razlikovale, $\geq 0,69$ u epiteloidnim stanicama u tuberkuloznim granulomima, a $\leq 0,69$ u sarkoidnim granulomima^{74,101}. Okabe i sur. mjerili su sadržaj DNA u kulturama stanica sarkoidnih granuloma porijeklom iz limfnih čvorova, većina epiteloidnih stanica bila je aneuploidna ili hipodiploidna¹⁰². Pretpostavili su virusnu infekciju kao jedan od mogućih uzroka aneuploidije¹⁰³. Slično su zamijetili Ornvold i sur. u stanicama sarkoidnog granuloma u parafinskim rezovima analiziranim protočnim citometrom¹⁰⁴.

Prednost i vrijednost morfometrije nasuprot drugim morfološkim metodama je da omogućuje predstavljanje nalaza u brojčanoj formi, izračunavanje vjerojatnosti izgleda određenog morfološkog nalaza u različitim bolestima, te predviđanje napredovanja, odnosno ishoda različitih bolesti^{64,70,78,101}.

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na temelju literaturnih podataka iz dosadašnjeg saznanja o ovoj problematici izvedene su slijedeće hipoteze:

1. Makrofagi u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom veličinom i ultrastrukturom razlikuju se od makrofaga u osoba bez patoloških promjena u respiratornom traktu i bolesnika sa bolestima intersticija koje nisu sarkoidoza. Jezgre su različite veličine, oblika i strukture kromatina. Postoje morfometrijski i citometrijski pokazatelji koji bi mogli egzaktnije opisati varijacije veličine i oblika, kao i sadržaj DNA jezgara makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom.
2. Makrofagi u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom odlikuju se pojačanom sintezom i otpuštanjem niza citokina i faktora rasta. Obzirom na povećanu metaboličku aktivnost očekuje se postojanje ne-diploidnih populacija makrofaga, kao i odstupanja u frakcijama faza staničnog ciklusa makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom.
3. Akutni i kronični oblik sarkoidoze razlikuju se prema kliničkim pokazateljima i tijeku bolesti. Očekuje se postojanje razlika u morfometrijskim i citometrijskim pokazateljima među jezgrama makrofaga ovisno o obliku sarkoidoze.
4. Dio makrofaga u BAL-bolesnika sa sarkoidozom pokazuje morfometrijske varijacije jezgri od ovalnih do sličnih epiteloidnim. Očekuje se postojanje kombinacija morfoloških parametara površine, opsega, polumjera, faktora oblika i faktora izduženosti koje mogu opisati i izdvojiti ove varijacije oblika.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ustanoviti morfometrijske parametre jezgara makrofaga i karakteristike jezgara makrofaga statičkom DNA citometrijom u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom.
2. Utvrditi postoje li razlike u morfometrijskim i DNA citometrijskim karakteristikama jezgara makrofaga bolesnika sa sarkoidozom akutnog i sarkoidozom kroničnog oblika.
3. Utvrditi postojanje morfometrijskih parametara koji bi izdvojili jezgre makrofaga morfologije slične epiteloidnim stanicama u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom.
4. Utvrditi postojanje staničnih populacija makrofaga ili pojedinih makrofaga ne-diplodnih DNA citometrijskih karakteristika, kao i promjene u frakcijama faza staničnog ciklusa jezgara makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom.
5. Utvrditi kliničko značenje i dijagnostičku vrijednost izdvojenih morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara jezgara makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom.

3. BOLESNICI I METODE RADA

3.1. Kriteriji za uključivanje ispitanika

Ispitivanje je provedeno u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“. U ispitivanje su uključena 73 ispitanika: 33 ispitanika u skupini sarkoidoze i to 16 ispitanika sa akutnim i 17 ispitanika sa kroničnim oblikom sarkoidoze, 30 ispitanika u skupini bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza, te 10 ispitanika kontrolne skupine bez bolesti pluća. Svi ispitanici su bolesnici hospitalizirani u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“ od siječnja 2005. do srpnja 2008. godine, a korišteni su klinički podaci iz arhiviranih povijesti bolesti. Mjerenja su provedena na citološkim preparatima bronhoalveolarnih ispiraka iz arhive Citološkog laboratorija.

U ispitivanje su uključeni bolesnici sa bolestima plućnog intersticija u kojih je dijagnoza postavljena na osnovu važećih kriterija i konsenzusa.

Kriteriji za odabir bolesnika bili su:

- učinjeno bronhoalveolarno ispiranje (BAL)
- limfocitni alveolitis (više od 15% limfocita) u bronhoalveolarnom ispirku (BAL)
- dijagnoze bolesti plućnog intersticija razvrstane na sarkoidozu i bolesti plućnog intersticija koje nisu sarkoidoza.
- bolesnici sa sarkoidozom podijeljeni su u dvije skupine obzirom na akutni i kronični pojavni oblik bolesti.

Iz etičkih razloga kontrolnu skupinu nisu sačinjavali zdravi dobrovoljci, nego ispitanici kojima je bronhoalveolarno ispiranje učinjeno u sklopu obrade iz drugih razloga (najčešće na njihov zahtjev ili zahtjev invalidske komisije radi detekcije azbestnih tjelešaca), te u bolesnika u kojih kasnijom obradom nije dokazana plućna bolest. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Klinike za plućne bolesti „Jordanovac“.

3. 2. Bronhoalveolarno ispiranje i obrada ispirka

Bronhoalveolarno ispiranje izvođeno je tijekom bronhoskopije fleksibilnim bronhoskopom u području srednjeg reznja, instilacijom 200 ml 0,9%-tne otopine NaCl zagrijane na 37⁰C i podijeljene u 4 frakcije (4x50 ml), prema prihvaćenim

preporukama. Citološka (kvalitativna i semikvantitativna) obrada lavata provođena je u skladu s prihvaćenim preporukama Europskog respiratornog društva^{36,105}.

Svi ispirci standardno su obrađeni u citocentrifugi (Shandon Cytospin 4, UK), a dobiveni citološki preparati obojeni su May-Grünwald-Giemsa metodom (MGG). Biranje stanica i određivanje staničnog sastava izvršeno je prema prihvaćenim preporukama¹⁰⁵.

3.3. Morfometrija i DNA citometrija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku

Izvršeno je bojanje jezgara makrofaga po Feulgenu za morfometriju i statičku DNA citometriju. Korišteni su odbojani, prethodno rutinski MGG (May-Grunwald–Giemsa) obojani citocentrifugati bronhoalveolarnih ispiraka bolesnika sa sarkoidozom, bolesnika sa bolestima intresticija koje nisu sarkoidoza i ispitanika kontrolne skupine.

Za mjerenja su odabrane dobro očuvane jezgre makrofaga koje se ne preklapaju u razmazima obojanim po Feugenu u svjetlosnom mikroskopu pod povećanjem 1000x (Imerzioni objektiv 100x, imerziona ulje, fr=1,516). Uz jezgre makrofaga odabrane su i jezgre stanica koje se koriste kao interne kontrole: neutrofilni granulociti ili mali limfociti.

Svi uzorci prethodno su rutinski citocentrifugirani pod istim uvjetima (brzina, sila, trajanje). Stanice se pri citocentrifugiranju nakupljaju slučajno, metodom staničnog taloženja.

Odabir stanica vršen je sustavno nasumce, pomicanjem pokretnog mikroskopskog stolića kao pri rutinskom citološkom pretraživanju: od vrha do dna, slijeva na desno. Odabrane stanice postavljene su u sredinu vidnog polja i fotografirane visokorezolucijskom kamerom u boji pričvršćenom na mikroskop, pod istim uvjetima (isti intenzitet osvjetljenja). Odabir stanica započinjao je na točki unutar područja gdje je stanični uzorak jednolično raspoređen, nastavljao se od stanice do stanice u jednom vidnom polju, od jednog do drugog vidnog polja. Pri tome su u istom polju mjereni ispitivani makorfagi i referentne stanice, ako su nađene⁷⁶. Morfometrija i statička DNA citometrija odabranih i fotografiranih stanica izvršena je uz interaktivno označavanje jezgara kompjuterskim „mišem“ i ručnu korekciju. Mjerenja su obavljena na osobnom računalu s podržavajućim programom “SFORM” tvrtke VAMSTEC, Zagreb.

Na najmanje 100 ispitivanih jezgara makrofaga svakog uzorka izmjereni su:

a) Morfometrijski planimetrijski parametri jezgara makrofaga:

Jednostavni:

površina, konveksnost (ConvA), opseg, najmanji polumjer (MinR), najveći polumjer, (MaxR), duljina i debljina.

Složeni parametri za mjeru nepravilnosti objekta – izračunati iz jednostavnih parametara:

faktor oblika (FF, od engl. *form factor*), formula: $4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2$, faktor izduženosti (FF izd), formula: $\text{dužina} / \text{debljina}$, omjer površine i konveksnosti (engl. *area/convex area*, ACA).

b) Statička DNA citometrija, odnosno određivanje integrirane optičke gustoće jezgara (engl. *Integrated Optical Density*, IOD) makrofaga, što predstavlja citometrijski ekvivalent sadržaja DNA ispitivanih jezgara. Ovo mjerenje izvršeno je na najmanje 100 ispitivanih jezgara makrofaga, te najmanje 10 jezgara kontrolnih stanica svakog uzorka.

Slijedilo je kvantitativno određivanje sadržaja DNA u jezgrama ispitivanih stanica uspoređivanjem vrijednosti IOD ispitivanih stanica (makrofaga) sa vrijednostima IOD stanica poznatog sadržaja DNA (neutrofilni granulociti, mali limfociti). Sadržaj DNA izražavan je (u „c“ skali, gdje je 2c prosječni sadržaj DNA normalnih diploidnih stanica u G₀/G₁ fazi ciklusa,) u obliku histograma^{71,72}. Svaki histogram prikazan je s 50 klasa IOD vrijednosti. Interpretacija dobivenih histograma DNA jezgara makrofaga skupina bolesnika i određivanje DI indeksa izvršeno je metodom po Van-Velthovenu⁸⁴:

Diploidni (DIP) -TIP I	DI >0,90 <1,15
Aneuploidni	
• triploidni (TR)– TIP II	DI > 1,40 < 1,60
• tetraploidni (TTR) – TIP III	DI > 1,90 < 2,20
• hiperdiploidni (HDI) - TIP IV	DI > 1,16 < 1,39
• hipertriploidni (HTR) – TIP V	DI > 1,61 < 1,89

U ovoj metodi analize histograma postotak stanica u S-fazi definiran je brojem stanica koje slijede u pet klasa nakon G₀/G₁ DNA-vrha diploidnog i hiperdiploidnog tumora, šest klasa kod triploidnog i hipertriploidnog, odnosno sedam klasa kod

tetraploidnog tumora. Postotak stanica G2M faze definiran je kao broj stanica koje slijede iza S-faze.

Obzirom da se radilo o diploidnim, hiperdiploidnim, triploidnim i hipertriploidnim histogramima, osim određivanja S i G2M faze, preostali dio histograma analiziran je i modificiranom metodom po Kardum⁷⁸. Modifikacija je prvotno provedena u bolesnika sa kroničnom limfocitnom bolešću. Iako se radi o malignim stanicama, one su pretežno diploidne. Ova modificirana metoda analize diploidnog tipa histograma pokazala je dobru korelaciju s kliničkim parametrima.

- posebno je izračunavan udio stanica u vrhu DNA histograma
- udio stanica manji od vrha (PIK-a)
- udio stanica manji od vrha (PIK-a)

Tako je određen postotak stanica prije vrška histograma (% prije), postotak stanica u vršku histograma (% vršak) i postotak stanica poslije vrška histograma (% poslije).

3.4. Podaci prikupljeni tijekom istraživanja

Prikupljeni su sljedeći podaci o bolesnicima s bolestima intersticija i ispitanicima kontrolne skupine bez plućne bolesti:

- dob
- spol
- citološki nalaz staničnog sastava brohoalveolarnog ispirka - postotak limfocita
- omjer CD4 i CD8 T limfocita
- oblik početka bolesti (akutni, kronični) u sarkoidozi
- radiološki stadij bolesti u sarkoidozi:
- morfometrijski parametri: površina, opseg, najmanji polumjer (MinR), najveći polumjer (MaxR), duljina, debljina, faktor oblika (FF), faktor izduženosti (FF izd), konveksnost (ConvA), površina/konveksnost (ACA).
- IOD vrijednosti jezgara makrofaga i jezgara kontrolnih stanica u obliku histograma kao rezultat mjerenja statičkom DNA citometrijom
- vrijednost DNA indeksa (DI) ispitivane populacije makrofaga određena metodom po VanVelthovenu.
- postotak stanica metodom po Kardum: prije vrška histograma (% prije), postotak stanica u vršku histograma (% vršak), postotak stanica poslije vrška histograma (% poslije), postotak stanica u S-fazi (% S), postotak stanica u G2M- fazi (% G2M)

3.5 Statističke metode

Statistička obrada podataka provedena je u statističkom programskom paketu Statistica for Windows, Release 6 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK).

Temeljem preliminarnih rezultata te potrebnih višestrukih usporedbi izračunata je potrebna veličina uzorka koja osigurava statističku snagu veću od 80% uz $\alpha=0,05$.

Za opis kontinuiranih varijabli korištena je aritmetička sredina, medijan, standardna devijacija te raspon ovisno o raspodjeli, a za usporedbu među skupinama korištena je analiza varijance u slučaju normalne raspodjele varijable odnosno Kruskal-Wallis ANOVA u suprotnom. Kategorijske varijable prikazane su kao učestalost (%). Za usporedbu raspodjele kategorijskih varijabli među skupinama korišteni su χ^2 test ili Fisherov egzaktni test. Multivarijatnom diskriminativnom analizom uz korištenje stupnjevitog eliminiranja varijabli (*engl. backward step-wise*) modelirani su skupovi varijabli morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara koji omogućuju razlikovni kriterij (dijagnostički prag) za dijagnozu akutne odnosno kronične sarkoidoze u odnosu na kontrolnu odnosno skupinu bolesnika s intersticijskom bolesti pluća koja nije sarkoidoza. Kako je navedenim modeliranjem dobiven skup varijabli koji 100%-tno razlikuje ispitivane skupine međusobno, nije bilo potrebe za formiranjem tablica kontingencije za usporedbu s postojećim dijagnostičkim standardom za sarkoidozu te za izračunavanje osjetljivosti, specifičnosti, pozitivne (PPV) i negativne prediktivne vrijednosti (NPV), dijagnostičke točnosti (DA), omjera vjerojatnosti (LR) i dijagnostičke šanse (DO). Kao statistički značajna koristila se razina značajnosti $p<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Opće karakteristike ispitivanih skupina

Uključena su 73 bolesnika: 10 ispitanika u kontrolnoj skupini i 63 bolesnika s definiranim bolestima intersticija, koji su prema konačnoj dijagnozi grupirani u 3 skupine. Struktura skupina i zastupljenost pojedinih bolesti prikazana je u tablici 8.

Tablica 8. Struktura skupina bolesnika prema bolestima.

SKUPINA	BOLESTI	Broj bolesnika
Sarkoidoza		
1.	Sarkoidoza akutnog oblika (S1)	16
2.	Sarkoidoza kroničnog oblika (S2)	17
	Ukupno:	33
3.	Bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza (NS)	
	- Hipersenzitivni pneumonitis	11
	- Medikamentozni pneumonitis (plućne nuspojeva lijekova)	6
	- BOOP	3
	- IPF	1
	- UIP/IPF	1
	- Silikoza	1
	- Reumatoidni artritis	2
	- Kolagenoza	4
	- Eritemski lupus	1
	Ukupno:	30
4.	Kontrolna skupina bez bolesti pluća (K)	10
	Ukupno bolesnika:	73

Izmjereno je 10706 jezgara makrofaga 73 BAL-a: 9830 ispitivanih jezgara – prosječno 134,7 po uzorku i 876 jezgara kontrolnih stanica – prosječno 12 po uzorku. Pri morfometriji i DNA analizi promatrano je 16 parametara, dok je 7 kliničkih parametara korišteno za definiranje i opis uzorka. Ispitivani parametri navedeni su u tablici 9.

Tablica 9 : Ispitivani morfometrijski, DNA citometrijski i klinički parametri

ISPITIVANI PARAMETRI (23)		
MORFOMETRIJSKI (10)	Jednostavni: Površina Opseg Konveksnost Duljina Debljina Najveći polumjer Najmanji polumjer	Složeni: Faktor oblika (FF) Faktor izduženosti (FFizd) Površina/konveksnost (ACA)
DNA CITOMETRIJSKI (6)	DNA indeks (DI) Postotak stanica prije vrška histograma Postotak stanica u vršku histograma Postotak stanica poslije vrška histograma Postotak stanica u S-fazi Postotak stanica u G2M-fazi	
KLINIČKI (7)	Dob Spol Postotak limfocita Omjer CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita Ekstratorakalni oblik sarkoidoze Radiološki stadij bolesti Morfološka dijagnoza	

Među ispitivanim skupinama nema statistički značajne razlike u spolu, ali postoje statistički značajne razlike u dobi, postotku limfocita i omjeru CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita u BAL-u, što je očekivano obzirom na različite kliničke karakteristike ispitivanih skupina (tablica 9). Među skupinama bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika, međutim, nađene su statistički značajne razlike u raspodjeli po spolu, ali nisu nađene statistički značajne razlike u postotku limfocita i omjeru CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita u BAL-u (tablica 10).

U bolesnika sa sarkoidozom nema statistički značajne razlike obzirom na prisutnost ekstratorakalne sarkoidoze, ali su nađene statistički značajne razlike u radiološkom stadiju bolesti između bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika (tablica 11).

Dijagnostički mikroskopsko-morfološki nalaz za sarkoidozu bio je nalaz elementa granuloma bez nekroze, potvrđen histološki i/ili citološki. Među ispitivanim skupinama bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika nađene su statistički značajne razlike obzirom na vrstu morfološke potvrde bolesti (tablica 12).

Tablica 10. Karakteristike pojedinih skupina bolesnika (dob, spol, postotak limfocita, omjer CD4/CD8 T limfocita u BAL-u) i statistička značajnost razlika među skupinama

	Sarkoidoza		Bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza n=30	Kontrolna skupina n=10	Statistička značajnost
	Sarkoidoza akutnog oblika n=16	Sarkoidoza kroničnog oblika n=17			
Dob	38,60±9,08	40,41±9,14	55,97±15,67	52,5±3,64	F= 7,160 p<0,001
Spol m/ž	4/12*	11/6*	14/16	4/6	X ² =5,382 df=3 p=0,146 * X ² =5,241 df=1 p=0,022
% limfocita	34,84±22,13	37,29±14,48	44,83±20,89	10,00±3,64	F= 18,906 p<0,001
CD4/8 T limfocita	8,33±3,63	6,88±4,75	2,00±1,23	1,76±0,51	F= 18,754 p<0,001

Vrijednosti za dob, % limfocita i CD4/CD8 izražene su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

* Vrijednosti za skupine sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika koje se statistički značajno razlikuju

Tablica 11. Razlike obzirom na prisutnost ekstratorakalne bolesti i radiološki stadij bolesti između bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika i njihova statistička značajnost (p –vrijednosti).

	Ekstratorakalna sarkoidoza		Radiološki stadij bolesti		
	ne	da	1	2	3
1. Sarkoidoza akutnog oblika	8	8	12	4	0
2. Sarkoidoza kroničnog oblika	7	10	6	10	1
	Fisher-ov test p=0,732		X ² = 5,519 df=1 p=0,019		

Radiološki stadij bolest: 1. bihilarna limfadenopatija, 2. bihilarna limfadenopatija s promjenama plućnog intersticija, 3. intersticijske promjene bez hilarne limfadenopatije

Tablica 12. Mikroskopska morfološka dijagnoza bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika. Razlike obzirom na postojanje i vrstu morfološke dijagnoze i njihova statistička značajnost (p –vrijednosti).

	Morfološka dijagnoza		Morfološka dijagnoza			
	sa	bez	PHD	cito	PHD+cito	bez
1. Sarkoidoza akutnog oblika	12	4	4	7	1	4
2. Sarkoidoza kroničnog oblika	16	1	4	4	8	1
			X ² =8,0397 df=3 p=0,045			

4.2. Morfometrijski i DNA citometrijski parametri jezgara makrofaga ispitanika

Utvrđene su statistički značajne razlike među skupinama analizom varijance – ANOVA ($p < 0,001$) u svim varijablama: prosjek (Pr), medijan (Med), minimum (Min), maksimum (Max) i standardna devijacija (SD), morfometrijskih parametara površine, opsega, konveksnosti, dužine i najvećeg polumjera jezgara makrofaga.

Statistički značajne razlike među skupinama utvrđene su također u varijablama Max i SD najmanjeg polumjera jezgara, Max, Min i SD debljine jezgara, Pr, Max, Min i SD omjera površine i konveksnosti jezgara, Max i Min faktora oblika (FF), Pr, Med, Max i i SD faktora izduženosti (FF izd), te u denzitometrijskom određivanju DNA sadržaja jezgara makrofaga - postotku jezgara u S-fazi staničnog ciklusa, te u DNA indeksu (DI) određenom metodom po VanVelthovenu.

Nisu nađene statistički značajne razlike među skupinama u varijablama parametara: najmanji polumjer, (Pr, Med, min); omjera površine i konveksnosti – ACA (Med); u debljini jezgara (Pr i Med); faktoru oblika -FF (Pr, Med, SD); faktoru izduženosti - FF izd (Min); te u denzitometrijskom određivanju DNA sadržaja jezgara makrofaga: postotak jezgara prije vrška u histogramu, postotak jezgara u vršku histograma, postotak jezgara poslije vrška u histogramu, postotak stanica u G2M fazi u denzitometrijskom histogramu (tablica 13).

4.2.1. Površina

Najveće vrijednost varijabli površine jezgara makrofaga (prosijek vrijednosti) bile su u skupini ne-sarkoidoza. Najveća varijabilnost među površinama opisana standardnom devijacijom vrijednosti površina (SD) bila je u skupini sarkoidoze kroničnog oblika. Namanje vrijednosti svih varijabli parametara nađene su u skupini ispitanika bez plućne bolesti (slika 7).

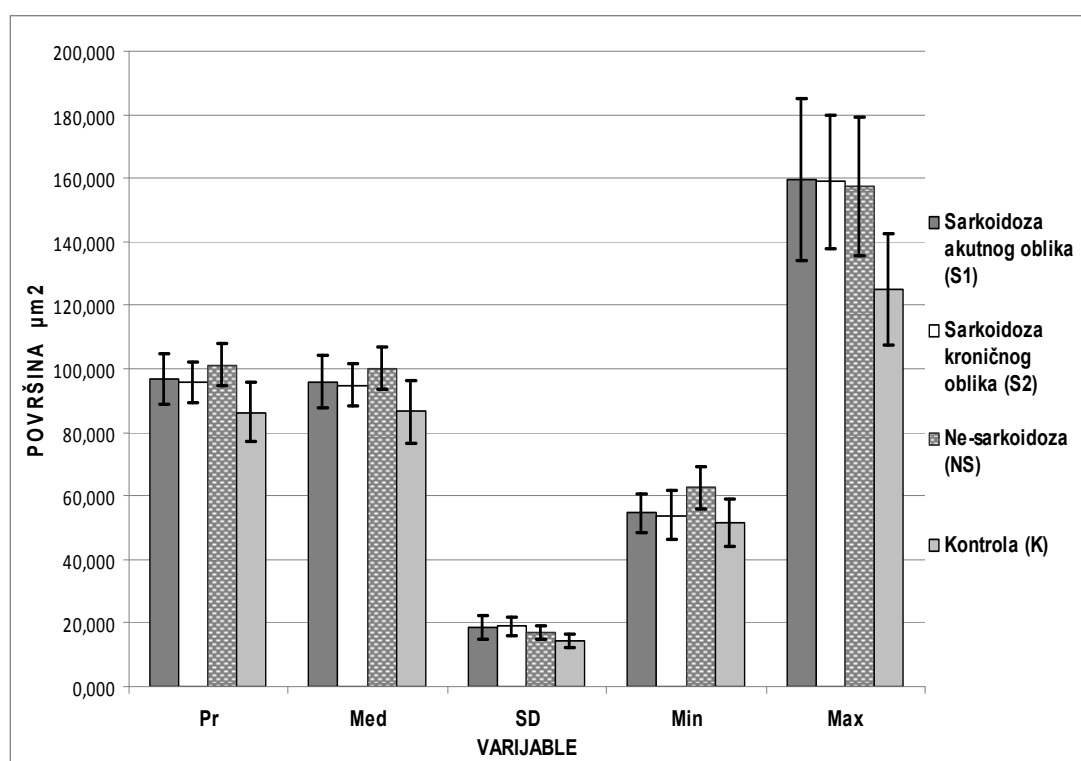
Tablica 13. Varijable morfometrijskih parametara i njihova statistička značajnost među skupinama ispitanika analizom varijance (ANOVA) i χ^2 – testom (p-vrijednosti).

Statistička značajnost među skupinama: $p < 0,001$ - $\uparrow\uparrow$, $p < 0,05$ - \uparrow , bez značajnosti - ns

MORFOMETRIJA					
	Pr	Med	Max	Min	SD
Površina	$\uparrow\uparrow$				
Opseg	\uparrow				
Konveksnost	$\uparrow\uparrow$				
Duljina	$\uparrow\uparrow$				
Debljina	ns	\uparrow			
Najduži polumjer	\uparrow				
Najkraći polumjer	ns	\uparrow	ns	\uparrow	
FF	ns	\uparrow			ns
FF izd	\uparrow		ns		$\uparrow\uparrow$
ACA	\uparrow	ns	\uparrow		
DNA CITOMETRIJA					
% prije vrška	ns				
% u vršku	ns				
% poslije vrška	ns				
% S-faza	\uparrow				
% G2M	ns				
DI (χ^2 -test)	\uparrow				

Utvrđene su statistički značajne razlike u svim varijablama površine jezgara makrofaga među skupinama ($p < 0,001$). Prosjek površina razlikuje sve skupine ispitanika osim skupina sarkoidoze akutnog i kroničnog oblika. Median i maksimum površina odvajaju zdrave ispitanike od bolesnika sa bolestima intersticija, dok SD površina odvajaju sarkoidozu kroničnog oblika od bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza. Minimumi površina odvajaju zdrave od ne-sarkoidoza (najveći minimumi u ne-sarkoidozi, a najmanji u zdravih), ali ne odvajaju zdrave od sarkoidoza, jer su vrijednosti gotovo identične.

Niti jedna varijabla parametra površina ne razlikuje skupine ispitanika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika (tablica 14).



Slika 7. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra površina jezgara za svaku skupinu ispitanika: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max), u μm^2 .

Tablica 14. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfometrijskog parametra površina jezgra (μm^2) u pojedinim skupinama ispitanika i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

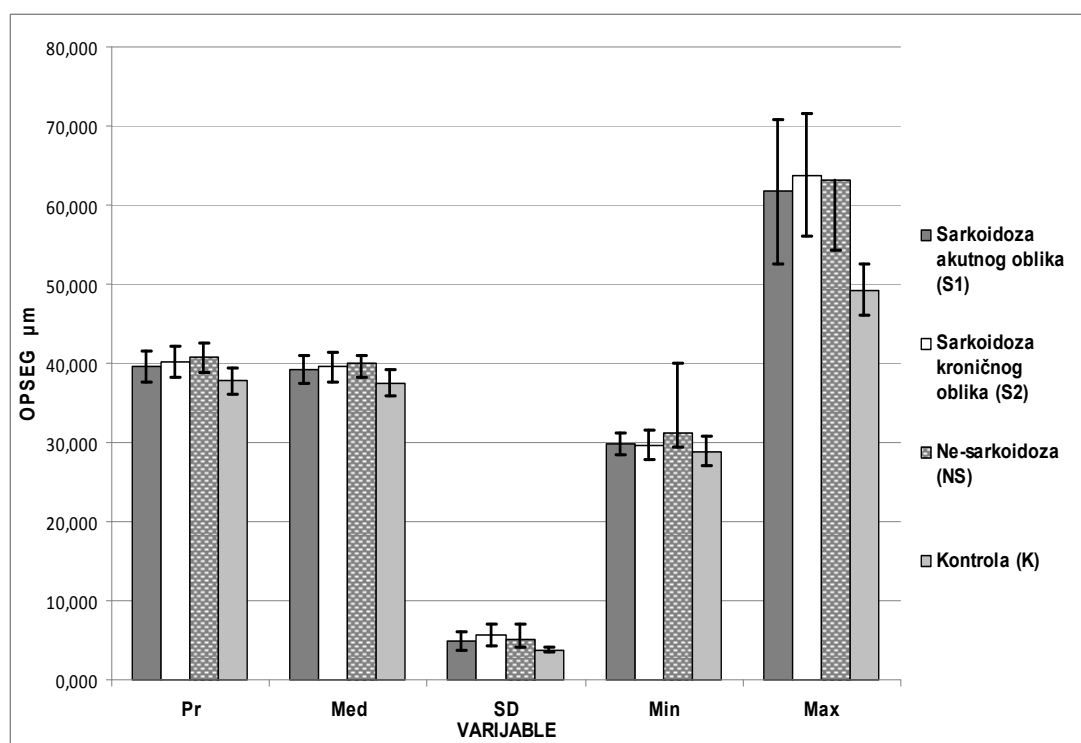
K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		POVRŠINA ANOVA									
Skupina	n	Prosjek		Medijan		SD		Max		Min	
		Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine
		F= 11,266 p < 0,001		F= 8,620 p < 0,001		F=8,000 p < 0,001		F=8,646 p < 0,001		F=10,091 p < 0,001	
K	10	86,3142	(NS)(S1)(S2)	86,4573	(NS)(S1)(S2)	14,2748	(NS)(S1)(S2)	125,0235	(NS)(S1)(S2)	51,5577	(NS)
NS	30	101,3078	(K)(S1)(S2)	100,1632	(K)	16,9687	(K)(S2)	157,5444	(K)	62,6324	(K)(S1)(S2)
S1	16	96,7991	(K)(NS)	96,0011	(K)	18,5330	(K)	159,5227	(K)	54,6673	(NS)
S2	17	95,6543	(K)(NS)	94,9409	(K)	19,0362	(K)(NS)	158,9488	(K)	53,9545	(NS)

4.2.2. Opseg

Najveće vrijednost varijabli opsega jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) bile su u skupini ne-sarkoidoza (Pr, Med, min) i sarkoidozi kroničnog oblika (Max, SD). Najmanje vrijednosti svih parametara nađene su, očekivano, u skupini ispitanika bez plućne bolesti (slika 8).

Utvrđene su statistički značajne razlike u svim varijablma parametra opseg jezgara makrofaga među skupinama ($p < 0,001$). Prosjek, medijan, maksimum i SD opsega omogućuju razlikovanje zdravih od bolesnih, a minimalne vrijednost opsega razlikuju zdrave ispitanike od bolesnika sa ne-sarkoidozom i ne-sarkoidoze od skupina bolesnika sa sarkoidozom. Niti jedna varijabla opsega ne odvaja skupine ispitanika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika (tablica 15).



Slika 8. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra opseg jezgara za svaku skupinu ispitanika: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max) u μm .

Tablica 15. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfolometrijskog parametra opseg jezgra (μm) u pojedinim skupinama ispitivanja i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

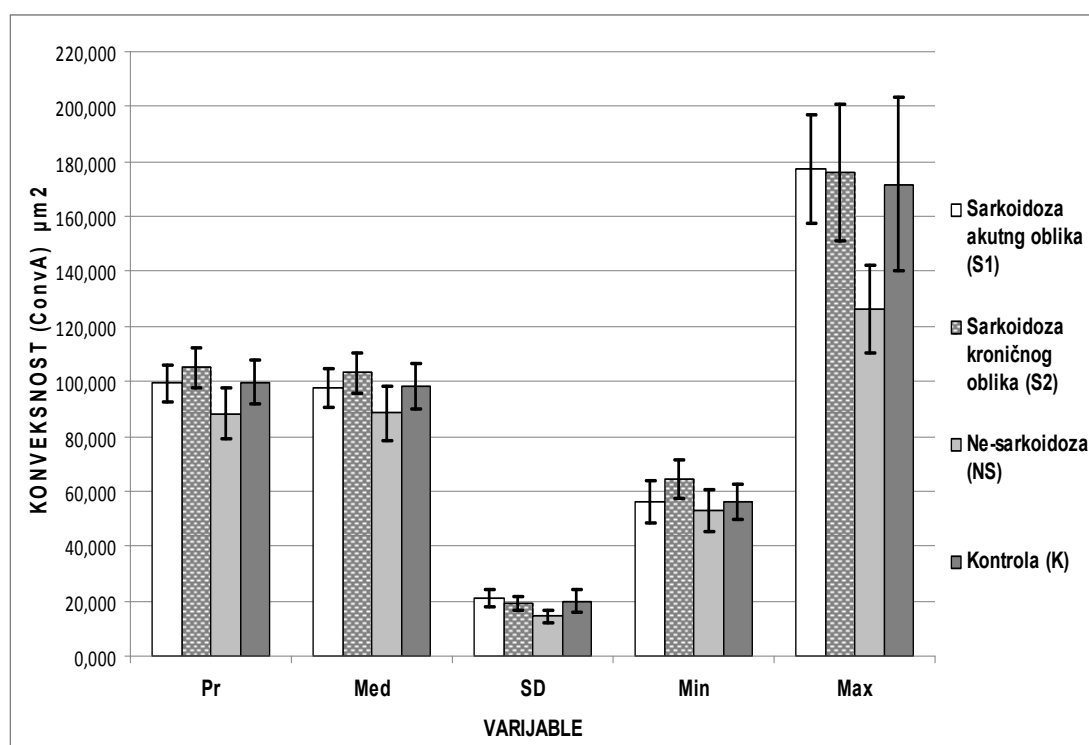
K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		OPSEG ANOVA									
Skupina	n	Prosijek		Medijan		SD		Max		Min	
		Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine
		F= 6,243 p = 0,001		F= 4,799 p = 0,004		F=6,942 p < 0,001		F=8,360 p < 0,001		F=6,001 p = 0,001	
K	10	37,7830	(NS)(S1)(S2)	37,4969	(NS)(S1)(S2)	3,7495	(NS)(S1)(S2)	49,2946	(NS)(S1)(S2)	28,8835	(NS)
NS	30	40,7899	(K)	39,9420	(K)	5,0150	(K)	63,0669	(K)	31,2388	(K)(S1)(S2)
S1	16	39,6806	(K)	39,1526	(K)	4,7143	(K)	61,7221	(K)	29,7720	(NS)
S2	17	40,2687	(K)	39,5199	(K)	5,4991	(K)	63,7759	(K)	29,7023	(NS)

4.2.3. Konveksnost

Najveće vrijednost varijabli konveksnosti jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) bile su u skupini sarkoidoze kroničnog oblika (Max i SD) i skupini ne-sarkoidoza (Med, Pr, min). Namanje vrijednosti svih parametara nađene su, očekivano, u skupini ispitanika bez plućne bolesti (slika 9).

Utvrđene su statistički značajne razlike u svim varijablama parametra konveksnost jezgara makrofaga među skupinama ($p < 0,001$). Prosjek, medijan i minimum konveksnosti odvajaju sve skupine ispitanika osim skupina sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika međusobno. SD i maksimum vrijednosti konveksnosti odvajaju ispitanike bez bolesti od bolesnika sa bolestima plućnog intersticija (tablica 16).



Slika 9. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra konveksnost jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max) u μm^2 .

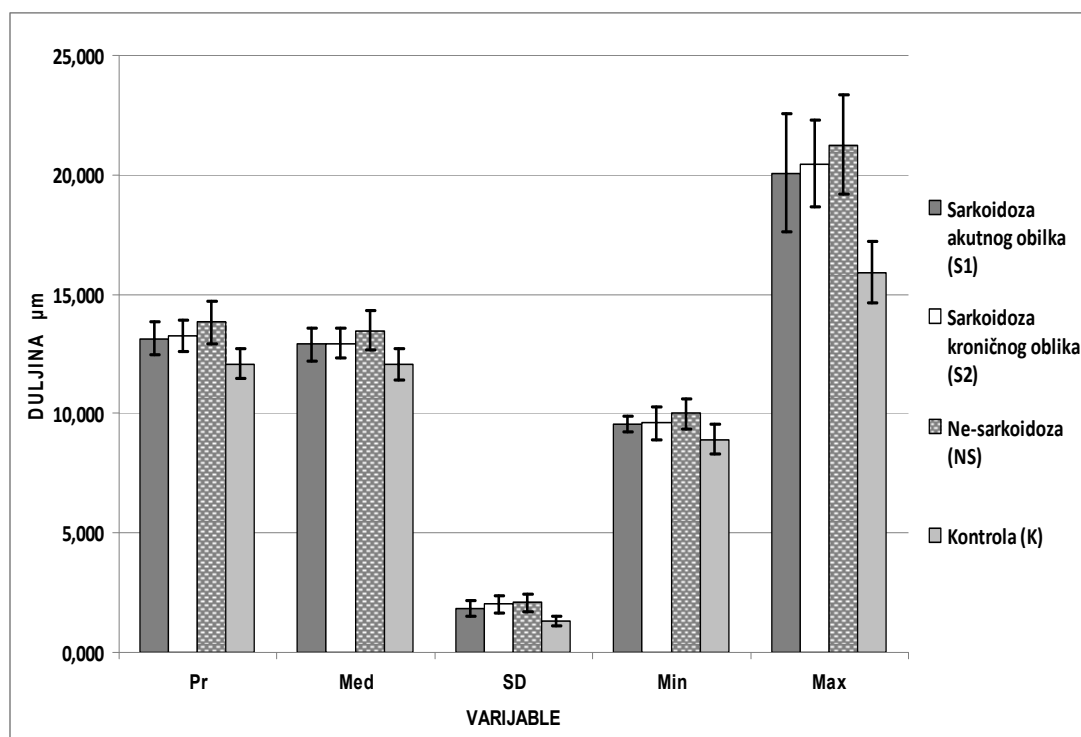
Tablica 16. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfometrijskog parametra konveksnost jezgra (μm) u pojedinim skupinama ispitivanja i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		KONVEKSNOST ANOVA									
Skupina	n	Prosijek		Medijan		SD		Max		Min	
		Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine
		F= 12,331 p = 0,001		F= 9,360 p = 0,001		F=11,103 p < 0,001		F=11,624 p < 0,001		10,713 p < 0,001	
K	10	88,2278	(NS)(S1)(S2)	88,3754	(NS)(S1)(S2)	14,4259	(NS)(S1)(S2)	126,3677	(NS)(S1)(S2)	52,9451	(NS)
NS	30	105,0324	(K)(S1)(S2)	103,1602	(K)(S1)	19,1614	(K)	175,8949	(K)	64,6661	(K)(S1)(S2)
S1	16	99,6635	(K)(NS)	98,2552	(K)(NS)	19,9877	(K)	171,6394	(K)	56,0591	(NS)
S2	17	99,2572	(K)(NS)	97,6330	(K)	21,2473	(K)	177,1800	(K)	56,3399	(NS)

4.2.4. Duljina

Najveće vrijednost varijabli duljina jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) bile su u skupini ne-sarkoidoza (Pr, min, Max i SD). Najmanje vrijednosti svih parametara nađene su, očekivano, u skupini ispitanika bez plućne bolesti (Slika 10). Utvrđene su statistički značajne razlike u svim varijablama duljine jezgara makrofaga među skupinama ($p < 0,001$). Prosjek, medijan i minimum duljine odvajaju sve skupine ispitanika osim skupina sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika. SD, maksimum i minimum vrijednosti duljine odvajaju skupine sa bolestima intersticija od kontrola (SD i skupinu sarkoidoza akutog oblika od ne-sarkoidoza, a minimumi i skupinu sarkoidoza kroničnog oblika od ne-sarkoidoza) (tablica 17).



Slika 10. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra duljina jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max) u µm.

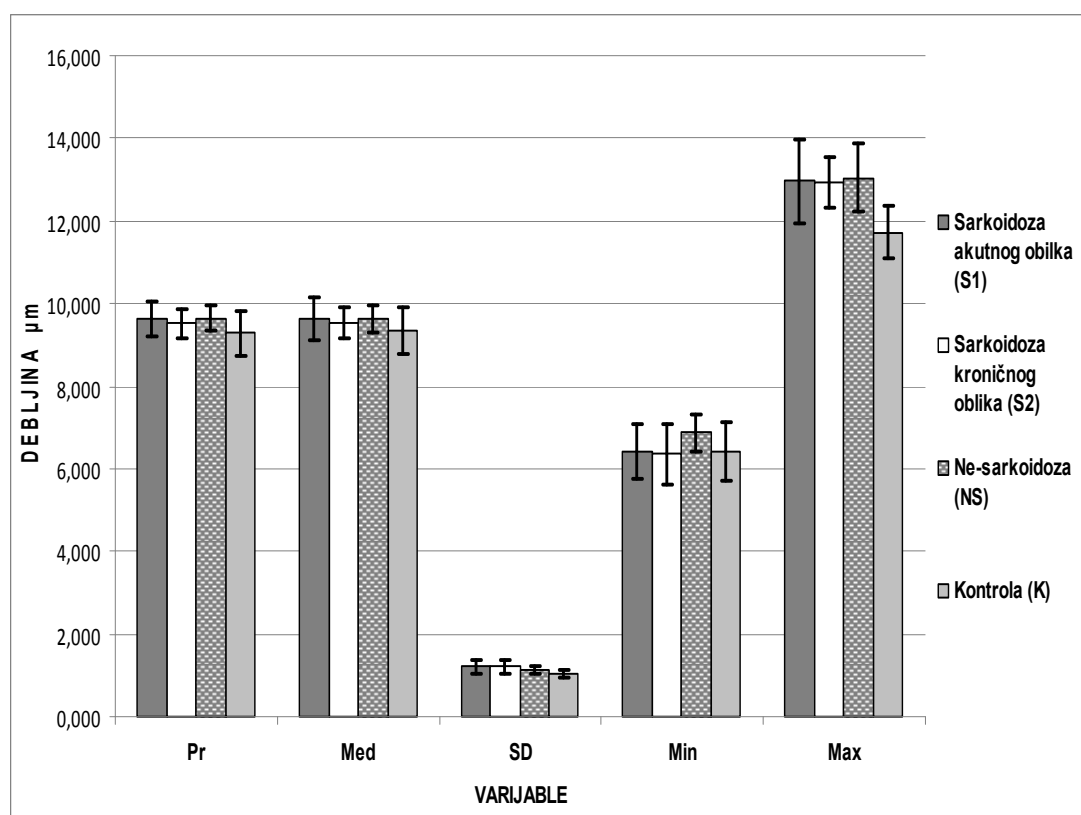
Tablica 17. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfolometrijskog parametra duljina jezgra (μm) u pojedinim skupinama ispitivanja i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		DULJINA ANOVA									
Skupina	n	Prosijek		Medijan		SD		Max		Min	
		Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine
		F= 13,568 p < 0,001		F= 9,346 P < 0,001		F=14,899 p < 0,001		F=17,633 p < 0,001		F=8,087 p < 0,001	
K	10	12,0856	(NS)(S1)(S2)	12,0748	(NS)(S1)(S2)	1,3127	(NS)(S1)(S2)	15,9279	(NS)(S1)(S2)	8,9356	(NS)(S1)(S2)
NS	30	13,8338	(K)(S1)(S2)	13,4794	(K)(S1)(S2)	2,0779	(K)(S1)	21,2630	(K)	9,9960	(K)(S2)
S1	16	13,1326	(K)(NS)	12,9065	(K)(NS)	1,8273	(K)(NS)	20,0818	(K)	9,5701	(K)
S2	17	13,2468	(K)(NS)	12,9536	(K)(NS)	2,0215	(K)	20,4690	(K)	9,6169	(K)(NS)

4.2.5. Debljina

Najveće vrijednost varijabli parametra debljine jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) raspoređene su u skupini ne-sarkoidoza (Max, Pr, min), sarkoidozi akutnog obilka (Med) i sarkoidozi kroničnog oblika (SD). Najmanje vrijednosti su u skupini ispitanika bez plućne bolesti (Max, Med, Pr, SD) i sarkoidozi kroničnog oblika (min) (slika 11).



Slika 11. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra debljina jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max) u μm.

Utvrđene su statistički značajne razlike u varijablama Max, min i SD debljine jezgara makrofaga među skupinama ($p < 0,05$). Nisu nađene statističke značajne razlike u varijablama prosjek i medijan parametra debljina jezgara među

skupinama. Maksimum i standardna devijacija debljine odvajaju skupinu ispitanika bez bolesti i skupine bolesnika sa bolestima intersticija. Minimalne vrijednosti debljine jezgara odvajaju skupinu ispitanika bez bolesti od skupina bolesnika sa bolestima intersticija, te skupine ispitanika sa sarkoidozom i ne-sarkoidozom. Niti jedna varijabla parametra debljina jezgara ne odvaja skupine ispitanika sa sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika (tablica 18).

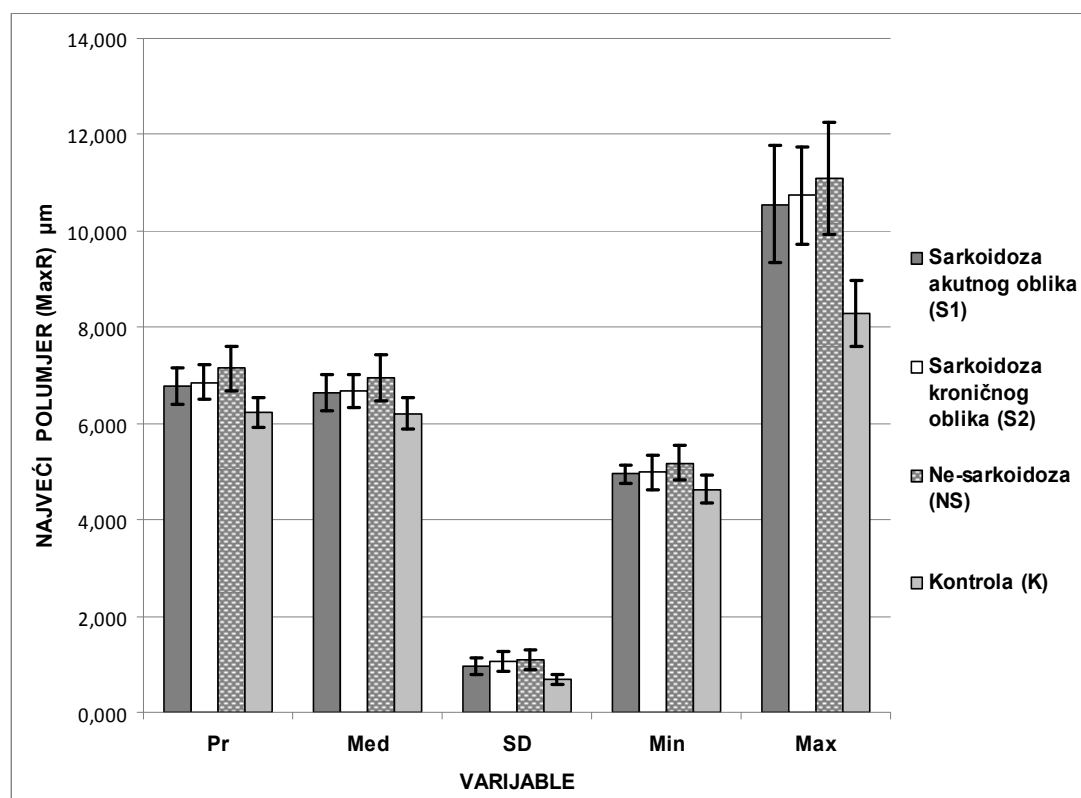
Tablica 18. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfolometrijskog parametra debljina jezgara (μm) u pojedinim skupinama ispitivanja i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		DEBLJINA ANOVA									
Skupina	n	Prosjek		Medijan		SD		Max		min	
		Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine
		F= 2,463 p = 0,070		F= 1,370 p = 0,259		F=6,266 p = 0,001		F=7,425 p < 0,001		F=8,087 p = 0,015	
K	10	9,2823		9,2823	1,0239	(NS)(S1)(S2)	11,7122	(NS)(S1)(S2)	6,4221	(NS)	
NS	30	9,6436		9,6436	1,1329	(K)	13,0357	(K)	6,8724	(K)(S1)(S2)	
S1	16	9,6397		9,6397	1,2080	(K)	12,9625	(K)	6,4096	(NS)	
S2	17	9,5176		9,5176	1,2109	(K)	12,9077	(K)	6,3519	(NS)	

4.2.6. Najveći polumjer

Najveće vrijednost varijabli parametra najveći polumjer jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) bile su u skupini ne-sarkoidoza. Najmanje vrijednosti bile su u skupini ispitanika bez plućne bolesti i skupini sarkoidoze kroničnog oblika (slika 12).



Slika 12. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra najveći polumjer jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max) u µm.

Utvrđene su statistički značajne razlike u svim varijablama parametra najveći polumjer makrofaga među skupinama ($p < 0,001$). Varijable prosjek, medijan i standardna devijacija parametra odvajaju sve skupine međusobno osim skupina sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika. Varijabla maksimum odvaja samo skupine

ispitanika sa i bez bolesti intersticija, a minimum vrijednosti parametra najveći polumjer jezgara odvaja još i skupine bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika od ne-sarkoidoza. Niti jedna varijabla parametra najveći polumjer jezgara ne odvaja skupine ispitanika sa sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika (tablica 19).

Tablica 19 Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfometrijskog parametra najveći polumjer jezgra (μm) u pojedinim skupinama ispitanika i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

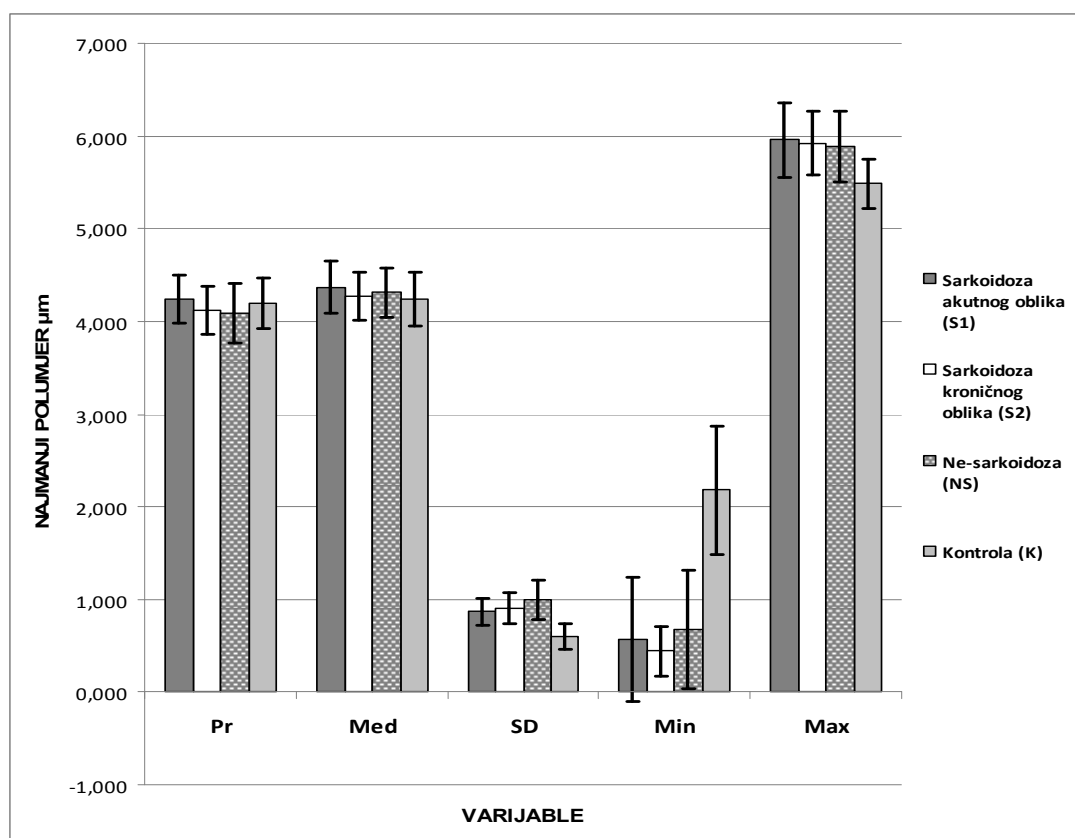
K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		NAJVEĆI POLUMJER ANOVA									
Skupina	n	Prosijek		Medijan		SD		Max		min	
		Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine
		F= 13,007 p < 0,001		F= 8,819 p < 0,001		F=14,754 p < 0,001		F=17,171 p < 0,001		F=7,811 p < 0,001	
K	10	6,2330	(NS)(S1)(S2)	6,2119	(NS)(S1)(S2)	0,6744	(NS)(S1)(S2)	8,2691	(NS)(S1)(S2)	4,6312	(NS)(S1)(S2)
NS	30	7,1451	(K)(S1)(S2)	6,9501	(K)(S1)(S2)	1,0982	(K)(S1)	11,0873	(K)	5,1855	(K)(S2)
S1	16	6,7772	(K)(NS)	6,6368	(K)(NS)	0,9558	(K)(NS)	10,5576	(K)	4,9465	(K)
S2	17	6,8551	(K)(NS)	6,6860	(K)(NS)	1,0731	(K)	10,7357	(K)	4,9812	(K)(NS)

4.2.7. Najmanji polumjer

Najveće vrijednost varijabli parametra najmanji polumjer jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) nađene su u skupini bolesnika sa sarkoidozom akutnog oblika (Max, Med, Min, Pr) i skupini ne-sarkoidoza (SD). Najmanje vrijednosti nađene su u skupini ispitanika bez bolesti (Max, Med, Min, SD) i skupini ne-sarkoidoza (Pr) (slika 13).

Utvrđene su statistički značajne razlike u varijablama Max i SD najmanjeg polumjera makrofaga među skupinama, $p < 0,05$. Nisu nađene statistički značajne razlike u varijablama Med, min i Pr parametra najmanji polumjer jezgara makrofaga. Varijable maksimum i standardna devijacija vrijednosti parametra odvajaju skupine ispitanika sa i bez bolesti, ali ne skupine bolesnika međusobno. Niti jedna varijabla parametra najmanji polumjer jezgara makrofaga ne odvajaju skupine ispitanika sa sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika (tablica 20).



Slika 13. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra najmanji polumjer jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max) u μm .

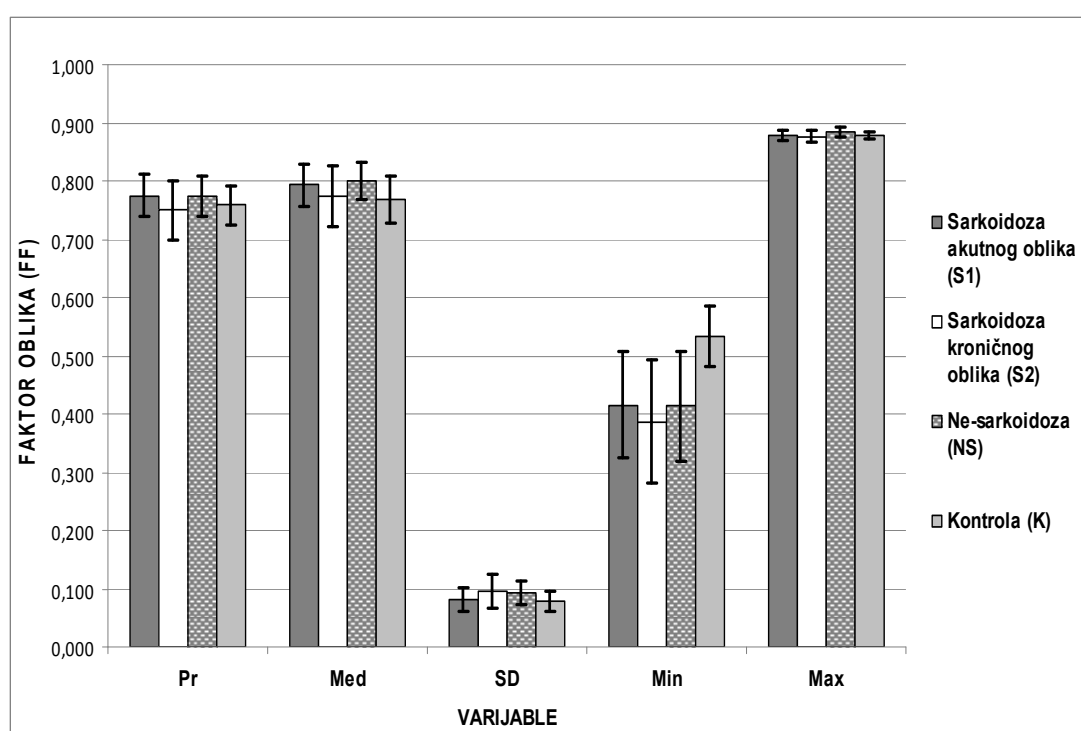
Tablica 20. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfolometrijskog parametra najmanji polumjer jezgara (μm) u pojedinim skupinama ispitivanja i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		NAJMANJI POLUMJER ANOVA									
Skupina	n	Prosijek		Medijan		SD		Max		min	
		Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine
K	10	4,1978		4,2418		0,6021	(NS)(S1)(S2)	5,4852	(NS)(S1)(S2)	0,2708	
NS	30	4,0910		4,3148		0,9977	(K)	5,8853	(K)	0,3038	
S1	16	4,2364		4,3697		0,8701	(K)	5,9597	(K)	0,4344	
S2	17	4,1183		4,2703		0,9061	(K)	5,9204	(K)	0,4416	
		F= 1,038 P =0,381		F=0,581 P =0,629		F=12,512 P <0,001		F=4,129 P =0,010		F=0,562 P = 0,642	

4.2.8. Faktor oblika (FF)

Najveće vrijednosti varijabli parametra faktor oblika (FF) jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) raspoređene su u skupinama bolesnika sa ne-sarkoidozom (Max, Med, Pr), sarkoidozom kroničnog oblika (SD), te u ispitanika bez bolesti (Min). Najmanje vrijednosti (Max, Min, Pr) nađene su također u skupini sarkoidoze kroničnog oblika i skupini bez plućne bolesti (Med, SD) (slika 14).



Slika 14. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra faktor oblika (FF) jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max).

Utvrđene su statistički značajne razlike u varijablama Max i Min parametra FF jezgara makrofaga među skupinama ispitanika ($p < 0,05$). Nisu nađene statistički

značajne razlike među skupinama u varijablama Med, Pr i SD parametra faktor oblika jezgara. Varijabla maksimum vrijednosti parametra odvaja skupine ispitanika sa sarkoidozom kroničnog oblika i skupinu ne-sarkoidoza, a minimum vrijednosti parametra odvaja skupine ispitanika sa i bez bolesti. Niti jedna varijabla parametra faktor oblika jezgara makrofaga ne odvaja skupine ispitanika sa sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika (tablica 21).

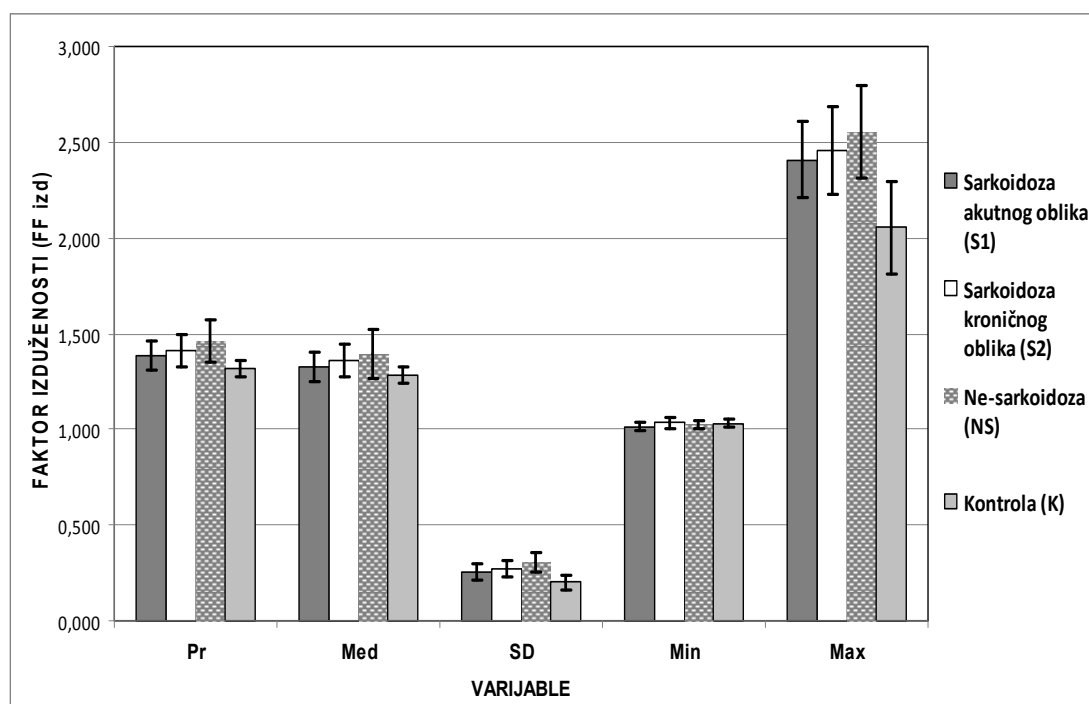
Tablica 21. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfolometrijskog parametra faktor oblika jezgra (FF) u pojedinim skupinama ispitanika i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		FAKTOR OBLIKA ANOVA									
Skupina	n	Prosijek		Medijan		SD		Max		min	
		Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine	Prosijek	Različito od skupine
		F= 1,763		F= 2,533		F=2,458		F=3,112		F=5,769	
		P =0,162		P =0,064		P =0,070		P =0,032		P = 0,001	
K	10	0,7583		0,7679		0,0790		0,8792		0,5330	(NS)(S1)(S2)
NS	30	0,7734		0,7998		0,0929		0,8837	(S2)	0,4133	(K)
S1	16	0,7750		0,7928		0,0803		0,8784		0,4155	(K)
S2	17	0,7499		0,7743		0,0963		0,8767	(NS)	0,3866	(K)

4.2.9. Faktor izduženosti (FF izd)

Najveće vrijednosti varijabli parametra faktor izduženosti (FF izd) jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) nađene su u skupini ispitanika sa ne-sarkoidozom (Max, Med, Pr i SD), te sarkoidozom kroničnog oblika (Min). Sve najmanje vrijednosti su u skupini ispitanika bez bolesti, osim varijable minimum u skupini bolesnika sa sarkoidozom akutnog oblika (slika 15).



Slika 15. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra faktor izduženosti (FFizd) jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max).

Utvrđene su statistički značajne razlike u svim varijablama osim minimuma parametra faktor izduženosti jezgara makrofaga (FF izd) među skupinama ispitanika ($p < 0,001$). Varijabla maksimum vrijednosti parametra odvaja skupine ispitanika sa i bez bolesti. Varijabla medijan odvaja skupine bez plućne bolesti i ne-sarkoidoze, a varijabla prosjek odvaja skupine bez bolesti, ne-sarkoidoze i skupinu sarkoidoza kroničnog oblika. Varijabla standardna devijacija parametra odvaja sve skupine osim skupina sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika (tablica 22).

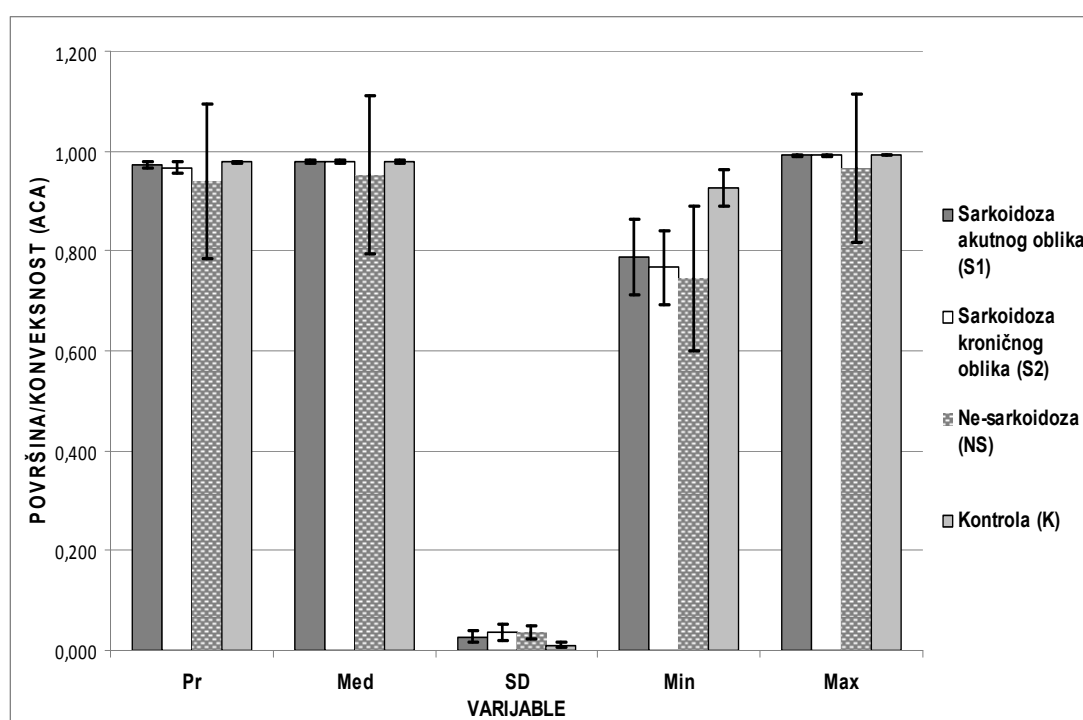
Tablica 22. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfolometrijskog parametra faktor izduženosti (FF izd) jezgara u pojedinim skupinama ispitanika i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

FAKTOR IZDUŽENOSTI										
ANOVA										
Skupina	n	Prosjek		Medijan	SD		Max	min	Različito od skupine	
		Prosjek	Različito od skupine		Prosjek	Različito od skupine				
		F= 6,954 P < 0,001		F= 3,758 P = 0,015	F=14,903 P < 0,001	F=11,767 P < 0,001	F=1,715 P = 0,172			
K	10	1,3180	(NS)(S2)	1,2848	(NS)	0,2007	(NS)(S1)(S2)	2,0533	(NS)(S1) (S2)	1,0305
NS	30	1,4616	(K)(S1)	1,3884	(K)	0,3072	(K)(S1)(S2)	2,5527	(K)	1,0272
S1	16	1,3837	(NS)	1,3238	(NS)	0,2568	(K)(NS)	2,4093	(K)	1,0154
S2	17	1,4137	(K)	1,3549	(K)	0,2737	(K)(NS)	2,4585	(K)	1,0336

4.2.10. Omjer površine i konveksnosti (ACA)

Najveće vrijednosti varijabli parametra omjer površine i konveksnosti jezgara makrofaga (prosjeci vrijednosti) nađene su u skupinama ispitanika sa ne-sarkoidozom (Med, SD), te skupini ispitanika bez bolesti (min i Pr). Gotovo identične maksimalne vrijednosti nađene se u svim skupinama ispitanika. Najmanje vrijednosti varijabli Med, min, Pr nađene su u skupini sarkoidoze kroničnog oblika, a SD u skupini ispitanika bez bolesti (slika 16).



Slika 16. Srednja vrijednost i standardna devijacija pojedinih varijabli morfometrijskog parametra površina/konveksnost (ACA) jezgara za svaku skupinu: prosjek (Pr), medijan (Med), standardna devijacija (SD), minimalna vrijednost (Min), maksimalna vrijednost (Max).

Utvrđene su statistički značajne razlike u svim varijablama osim medijana parametra omjer površine i konveksnosti (ACA) jezgara makrofaga među skupinama ispitanika ($p < 0,05$). Varijabla maksimum vrijednosti parametra odvoja

skupine ispitanika sa sarkoidozom kroničnog oblika i ne-sarkoidoze. Minimum vrijednosti parametra odvaja skupine ispitanika sa i bez bolesti. Prosjek vrijednosti parametra odvaja skupine bolesnika bez bolesti, sa ne-sarkoidozom i sarkoidozom kroničnog oblika. Varijabla standardna devijacija odvaja skupine ispitanika sa i bez bolesti. Niti jedna varijabla parametra omjer površine i konveksnosti jezgara makrofaga ne odvaja skupine ispitanika sa sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika (tablica 23).

Tablica 23. Prosjeci vrijednosti varijabli prosjek, medijan, standardna devijacija, maksimalna i minimalna vrijednost morfolometrijskog parametra površina/konveksnost (ACA) jezgara u pojedinim skupinama ispitanika i statistička značajnost razlika među skupinama (Anova).

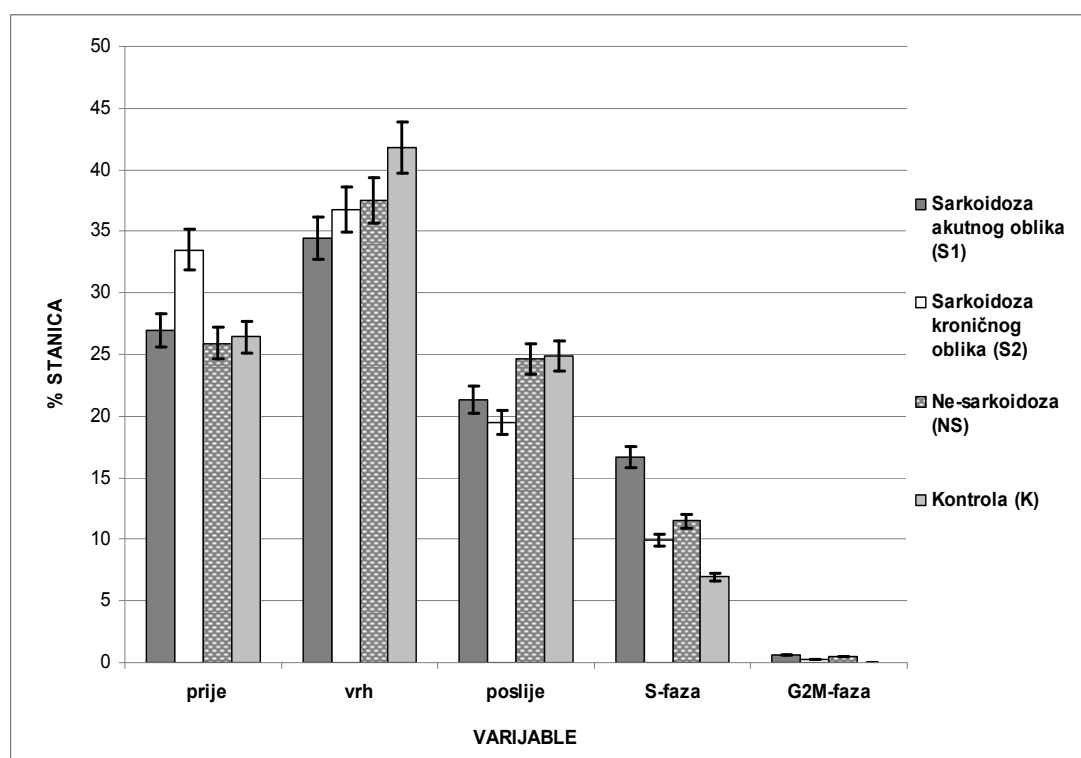
K- kontrola, NS – ne sarkoidoza, S1 – sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika

		POVRŠINA/KONVEKSNOŠT											
		ANOVA											
		Prosjek		Medijan		SD		Max		min			
		F= 3,704 P < 0,016		F= 1,512 P =0,219		F=11,504 P < 0,001		F=3,835 P =0,013		F=15,143 P < 0,001			
Skupina	n	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine	Prosjek	Različito od skupine		
K	10	0,9776	(NS)(S2)	0,9798	0,0108	(NS)(S1)(S2)	0,9923	0,9270	(NS)(S1)(S2)	0,9270	(NS)(S1)(S2)		
NS	30	0,9679	(K)	0,9817	0,0370	(K)(S1)	0,9924	0,7680	(S2)	0,7680	(K)		
S1	16	0,9730		0,9807	0,0271	(K)(NS)	0,9916	0,7883	(K)	0,7883	(K)		
S2	17	0,9670	(K)	0,9796	0,0360	(K)	0,9909	0,7672	(NS)	0,7672	(K)		

4.2.11. Analiza DNA histograma

Prosjeci postotaka stanica prije vrha histograma, u vrhu histograma, poslije vrha histograma, postotaka stanica u S-fazi i fazi G2M staničnog ciklusa za svaku skupinu ispitanika prikazani su na slici 17.

Najveći prosjeci vrijednosti % stanica prije vrha histograma nađeni su u skupini sarkoidoza kroničnog oblika, a najmanji u skupini ne-sarkoidoza. Najveći prosjek postotka stanica u vršku nađen je u skupini ispitanika bez bolesti, a najmanji u sarkoidozama akutnog oblika. Najveći prosjek postotka stanice poslije vrška je u skupini bez bolesti, a najmanji u skupini sarkoidoza kroničnog oblika. Postotak stanica u S-fazi i G2M fazi staničnog ciklusa najveći je u skupini sarkoidoza akutnog oblika, a najmanji u skupini ispitanika bez bolesti.



Slika 17. Srednje vrijednosti i standardne greške (+/- 1,96 SE) postotaka stanica u pojedinim dijelovima staničnog ciklusa: prije vrha, u vrhu, poslije vrha, S-fazi i G2M fazi; denzitometrijskom analizom DNA histograma jezgara makrofaga.

Utvrđene su statistički značajne razlike u postotku stanica u S-fazi staničnog ciklusa među skupinama ispitanika ($p < 0,05$) (Tablica 24). Ova varijabla odvaja skupinu sarkoidoza akutnog oblika od ostalih skupina, pa i skupine sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika međusobno.

Nisu nađene statistički značajne razlike u postocima stanica prije vrha histograma, u vrhu histograma, te G2M fazi staničnog ciklusa izmjerenih statičkom DNA citometrijom (tablica 13).

Analizom histograma DNA jezgara makrofaga određen je i DNA indeks (DI) za svakog ispitanika. Diploidni tip histograma je u rasponu $DI > 0,90 < 1,15$; aneuploidni su: hiperdiploidni sa $DI > 1,16 < 1,39$; triploidni $> 1,40 < 1,60$ i hipertriploidni $> 1,61 < 1,89$. Hiperdiploidni tip dominantan je u ispitanika bez bolesti, dok je triploidni/hipertriploidni dominantan u bolesnika ostalih skupina (tablica 25).

Nađene su statistički značajne razlike u DI među skupinama ispitanika (X^2 –test, $p = 0,017$), odnosno distribuciji hiperdiploidnog i triploidno /hipertriploidnog DI u skupinama (tablica 25).

Tablica 24. Značajnost razlika među skupinama za postotke jezgara makrofaga u S-fazi staničnog ciklusa (multivarijatna diskriminativna analiza, p-vrijednosti).

S1- sarkoidoza akutnog oblika, S2 – sarkoidoza kroničnog oblika, NS – ne-sarkoidoza, K – kontrola

	S1	S2	NS	K
S1		0,022	0,045	0,004
S2	0,022		0,550	0,355
NS	0,045	0,550		0,134
K	0,004	0,355	0,134	

Tablica 25. Raspodjela vrijednosti DI (DNA indeksa) analize histograma DNA jezgara makrofaga među skupinama i statistička značajnost razlika (X^2 test).

	Hiperdiploidni	Triploidni/ hipertriploidni	Ukupno
S1	6	10	16
S2	5	12	17
NS	5	25	30
K	7	3	10
Ukupno	23	50	73

$$X^2 = 10,229 \quad df=3 \quad p=0,017$$

4.3. Morfometrijske i citometrijske karakteristike pojedinih skupina bolesti

U kontrolnoj skupini ispitanika bez plućne bolesti nađeni su najmanje prosječne vrijednosti svih varijabli parametara površine, opsega, konveksnosti, duljine, debljine (osim minimuma), najvećeg polumjera, najmanjeg polumjera (osim prosjeka), medijana, minimuma i SD faktora oblika, te faktora izduženosti (osim minimuma) jezgara makrofaga.

Citometrijskom analizom DNA sadržaja nađen je najmanji postotak stanica u S-fazi i G2M-fazi, a najveći postotak stanica u vršku i poslije vrška u odnosu na ostale skupine bolesnika. Ovakva distribucija morfometrijskih i citometrijskih parametara pokazuje da su u skupini ispitanika bez bolesti jezgre makrofaga najmanje i najokruglije, uz lagano povišenu proliferativnu aktivnost.

Jezgre makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom akutnog oblika su među najvećima, jer su i najveće vrijednosti varijabli prosjek i medijan parametara: površina, debljine, najmanji polumjer i ACA, te najmanji prosjeci vrijednosti faktora izduženosti. Makofagi ovih bolesnika su i najaktivniji, jer je najveći postotak stanica u S-fazi i G2M fazi, a najmanji postotak stanica u vršku histograma.

Sarkoidozu kroničnog oblika karakteriziraju najveće prosječne vrijednosti standardnih devijacija (SD) površine, opsega, konveksnosti, debljine, faktora oblika (FF), faktora izduženosti (FF izd), najmanje prosječne vrijednosti minimuma debljine i FF, najveći prosjek minimalnih vrijednosti FF izd, ali i najveći prosjeci maksimalnih vrijednosti opsega i konveksnosti. U citometrijskoj DNA analizi najveći je postotak stanica prije vrška, a najmanji postotak stanica poslije vrška. Morfometrijski pokazatelji opisuju jezgre makrofaga bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika kao izrazito morfološki raznolike.

Jezgre makrofaga bolesnika sa bolestima plućnog intersticija koje nisu sarkoidoza morfometrijski su najveće stanice, ali se nađe i najviše izduženih i udubljenih oblika. Ove karakteristike opisuju najveći prosjeci i medijani vrijednosti površine, opsega, konveksnosti, duljine, debljine, faktora oblika (FF), faktora izduženosti (FF izd), ACA, te najmanji prosjek i SD najmanjeg polumjera. U analizi

DNA sadržaja nađe se najmanji postotak stanica prije vrška u histogramu, te povećan postotak stanica u S-fazi kao odraz proliferacijske aktivnosti.

4.4. Identifikacija varijabli morfometrijskih parametara koje omogućuju razlikovanje sarkoidoze akutnog i kroničnog oblika

Multivarijatnom diskriminativnom analizom uz korištenje stupnjevitog eliminiranja varijabli (*backward step-wise*) modelirani su skupovi varijabli koji omogućuju razlikovni kriterij za dijagnozu sarkoidoze akutnog i kroničnog oblika u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno skupinu bolesnika s intersticijskom bolesti pluća koja nije sarkoidoza.

Na taj način izdvojene su 43 varijable 15 morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara koje omogućuju razlikovanje (100%) ispitivanih skupina bolesti na osnovu mjerenja jezgara makrofaga u BAL-u: To su: površina (medijan, minimum, maksimum, SD), opseg (minimum, maksimum i SD), faktor oblika (prosjeak, medijan, maksimum i SD), faktor izduženosti (prosjeak, medijan, minimum), konveksnost (medijan, minimum, maksimum i SD), ACA (prosjeak, minimum, maksimum, SD), duljina (prosjeak, minimum, SD), debljina (prosjeak, medijan, minimum, maksimum i SD), najmanji polumjer (medijan, minimum, maksimum, SD), najveći polumjer (prosjeak, minimum, maksimum i SD), % stanica prije vrha, u vrhu i poslije vrha histograma, % stanica u S-fazi i G₂M fazi staničnog ciklusa (tablice 26 i 27).

Tablica 26. Multivarijatna diskriminativna analiza uz korištenje stupnjevitog eliminiranja varijabli (*backward step-wise*).

Prikaz modela na osnovu 43 varijable 15 morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara koje omogućuju potpuno međusobno razlikovanje svih skupina ispitanika (originalni ispis).

Broj varijabli u modelu: 43; Grupiranje: Grupa2 (4 skupine)						
Wilks' Lambda: 0,00433 F (129,81)=3,2645 p< 0,0000						
	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove	p-level	Toler.	1-Toler.
FFizd_Pr	0,009348	0,463663	10,41066	0,000100	0,000620	0,999380
FFizd_Med	0,004700	0,922270	0,75853	0,527168	0,012956	0,987044
LOG_FFizd_min	0,005568	0,778460	2,56128	0,075738	0,270272	0,729728
FF_Pr	0,005896	0,735182	3,24186	0,037508	0,004219	0,995781
FF_Med	0,006033	0,718480	3,52644	0,028183	0,007089	0,992911
LOG_FF_SD	0,005081	0,853037	1,55054	0,224282	0,046105	0,953895
FF_max	0,005285	0,820104	1,97422	0,141612	0,163941	0,836059
ConVA_Med	0,005521	0,785148	2,46280	0,084023	0,001480	0,998520
ConVA_SD	0,006388	0,678525	4,26407	0,013738	0,003137	0,996863
ConVA_min	0,007236	0,599019	6,02458	0,002801	0,005701	0,994299
ConVA_max	0,005174	0,837743	1,74315	0,181873	0,025956	0,974044
ACA_Pr	0,004815	0,900292	0,99676	0,409339	0,007283	0,992717
LOG_ACA_SD	0,005032	0,861348	1,44874	0,250607	0,037384	0,962616
ACA_min	0,005146	0,842359	1,68429	0,193888	0,079727	0,920273
ACA_max	0,005805	0,746724	3,05265	0,045480	0,277125	0,722875
Povr_Med	0,005642	0,768235	2,71516	0,064464	0,001286	0,998714
Povr_SD	0,006585	0,658271	4,67218	0,009358	0,004210	0,995790
Povr_min	0,006102	0,710296	3,67078	0,024424	0,008744	0,991256
Povr_max	0,004939	0,877542	1,25592	0,309195	0,030464	0,969536
Opseg_SD	0,007075	0,612627	5,69084	0,003738	0,006603	0,993398
Opseg_min	0,005883	0,736776	3,21538	0,038529	0,036677	0,963324
Opseg_max	0,004926	0,879942	1,22795	0,318745	0,041363	0,958637

MinR_Med	0,004984	0,869726	1,34808	0,279671	0,010084	0,989916
MinR_SD	0,006561	0,660684	4,62224	0,009803	0,049051	0,950949
MinR_min	0,008231	0,526572	8,09169	0,000528	0,188749	0,811251
MinR_max	0,005291	0,819255	1,98559	0,139886	0,090503	0,909497
MaxR_Pr	0,006219	0,696997	3,91255	0,019270	0,000390	0,999610
MaxR_SD	0,006068	0,714336	3,59911	0,026219	0,001754	0,998246
MaxR_min	0,006043	0,717257	3,54781	0,027590	0,025872	0,974128
MaxR_max	0,006869	0,630998	5,26312	0,005458	0,060190	0,939810
Dulj_Pr	0,007145	0,606632	5,83600	0,003295	0,000197	0,999803
Dulj_SD	0,005769	0,751318	2,97894	0,049053	0,002084	0,997916
Dulj_min	0,005244	0,826511	1,88915	0,155246	0,032246	0,967754
Deblj_Pr	0,007808	0,555109	7,21304	0,001048	0,000944	0,999056
Deblj_Med	0,006038	0,717877	3,53696	0,027889	0,011830	0,988170
Deblj_SD	0,005101	0,849662	1,59245	0,214273	0,057533	0,942467
Deblj_min	0,004912	0,882351	1,20002	0,328570	0,181810	0,818190
Deblj_max	0,005651	0,767073	2,73291	0,063282	0,109131	0,890869
% prije III	0,005373	0,806765	2,15566	0,116511	0,000000	1,000000
% vrh III	0,005373	0,806726	2,15620	0,116443	0,000000	1,000000
% poslije III	0,005370	0,807116	2,15081	0,117118	0,000000	1,000000
S-† III	0,005370	0,807219	2,14939	0,117297	0,000000	1,000000
G2M III	0,005331	0,813138	2,06823	0,127975	0,000048	0,999952

Tablica 27. Klasifikacijska tablica na osnovu 43 varijable 15 morfometrijskih i DNA citometrijskih prametara jezgara makrofaga BAL-a koje omogućuju potpuno razlikovanje skupina ispitanika.

Posebno su prikazane Mahalanobij-eve udaljenosti, F-vrijednosti i p-vrijednosti među skupinama ispitanika (originalni ispis).

K- kontrola, S1 – akutna sarkoidoza, S2 – kronična sarkoidoza, N – ne-sarkoidoza

Klasifikacijska tablica					
Redovi: Opažene klasifikacije					
Stupci: Predviđene klasifikacije					
	Postotak	K	S1	S2	N
K	100,0	10	0	0	0
S1	100,0	0	16	0	0
S2	100,0	0	0	17	0
N	100,0	0	0	0	30
Ukupno	100,0	10	16	17	30

Mahalanobij-eve udaljenosti

	K	S1	S2	N
K	0,00000	37,16459	72,71993	62,58343
S1	37,16459	0,00000	47,37385	36,02672
S2	72,71993	47,37385	0,00000	40,21306
N	62,58343	36,02672	40,21306	0,00000

F-vrijednosti; df = 43,28

	K	S1	S2	N
K		1,902384	3,811731	3,911673
S1	1,902384		3,337601	3,241212
S2	3,811731	3,337601		3,773278
N	3,911673	3,241212	3,773278	

p-vrijednosti

	K	S1	S2	N
K		0,037518	0,000182	0,000143
S1	0,037518		0,000600	0,000772
S2	0,000182	0,000600		0,000200
N	0,000143	0,000772	0,000200	

Diskriminativnom multivarijatnom analizom dobili smo i klasifikacijske funkcije – koeficijente 43 varijable morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara jezgara makrofaga BAL-a za svaku ispitanu skupinu, kao i konstante skupina. (tablica 28).

Tablica. 28. Klasifikacijske funkcije varijabli parametara sa pripadajućim koeficijentima i konstantama za svaku skupinu ispitanika dobivene multivarijatnom diskriminativnom analizom uz korištenje stupnjevitog eliminiranja varijabli - *backward step-wise* (originalni ispis).

Klasifikacijske funkcije; grupiranje				
	K	S1	S2	N
FFizd_Pr	3911145	3911066	3912739	3913008
FFizd_Med	-25454	-25549	-25383	-25456
LOG_FFizd_min	1154324	1154239	1154888	1154515
FF_Pr	2161281	2161203	2162013	2162487
FF_Med	-2146834	-2146873	-2147454	-2147862
LOG_FF_SD	-38934	-39032	-38954	-38992
FF_max	1162785	1163075	1163558	1163749
ConvA_Med	17327	17327	17325	17334
ConvA_SD	-44148	-44148	-44171	-44164
ConvA_min	14081	14080	14089	14084
ConvA_max	1407	1407	1407	1407
ACA_Pr	8426990	8426142	8427592	8428615
LOG_ACA_SD	186276	186325	186352	186355
ACA_min	123460	123404	123549	123492
ACA_max	-8622177	-8622687	-8626924	-8624778
Povr_Med	-22188	-22189	-22185	-22196
Povr_SD	32665	32666	32689	32678
Povr_min	-8933	-8931	-8937	-8933
Povr_max	352	352	352	353
Opseg_SD	117845	117845	117887	117885
Opseg_min	-3257	-3258	-3268	-3260
Opseg_max	-4555	-4555	-4555	-4556
MinR_Med	-147398	-147392	-147351	-147437

MinR_SD	189276	189262	189348	189350
MinR_min	29429	29433	29456	29441
MinR_max	33262	33264	33276	33251
MaxR_Pr	76591	76408	76759	76341
MaxR_SD	593649	593575	593948	594004
MaxR_min	105406	105415	105470	105472
MaxR_max	-36627	-36624	-36632	-36638
Dulj_Pr	-494000	-493875	-494297	-494081
Dulj_SD	-273852	-273838	-274021	-274039
Dulj_min	-25700	-25705	-25710	-25726
Deblj_Pr	829881	829861	830149	830202
Deblj_Med	-145866	-145866	-145946	-145912
Deblj_SD	-79865	-79847	-79940	-79875
Deblj_min	1745	1745	1746	1753
Deblj_max	-11003	-11003	-11009	-10997
% prije III	4154165	4154278	4154759	4154758
% vrh III	4155069	4155182	4155663	4155662
% poslije III	4151461	4151574	4152054	4152053
S-f III	4152714	4152827	4153307	4153306
G2M III	4144260	4144375	4144838	4144849
Konstanta	-210696509	-210706498	-210754444	-210758215

Svrstavanje jezgara makrofaga BAL-a u pojedine skupine bolesti, pa i skupine sa akutnim, odnosno kroničnim oblikom sarkoidoze na osnovu izmjerenih morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara moguće je izračunati uz pomoć dobivenih koeficijanata varijabli i konstanti skupina.

Potrebno je uvrstiti prosjek vrijednosti varijable parametra jezgre makrofaga, pomnožiti ga koeficijentom vezanim za skupinu, pribrojiti umnožak dobiven na isti način za svaku od 43 varijable i na kraju dodati konstantu.

Izračun:

Vrijednost varijable1 x koeficijent + vrijednost varijable2 x koeficijent ++ +
vrijednost varijable 43 x koeficijent + konstanta = suma umnožaka

Ovakav izračun (suma umnožaka) trebalo bi izvršiti za svaku skupinu, konkretno za sve četiri skupine. Dobivena izračun – suma umnožaka svrstava populaciju makrofaga u skupinu za koju je najveći. Dobiveni izračuni mogu predstavljati dodatne dijagnostičke nalaze koji svrstavaju populaciju jezgara makrofaga BAL-a ispitanika u određenu skupinu: bolesnici sa sarkoidozom akutnog oblika, bolesnici sa sarkoidozom kroničnog oblika, bolesnici sa bolesti intersticija koja nije sarkoidoza, te zdravi (bez bolesti intersticija).

Konačni rezultat multivarijatne diskriminativne analize uz korištenje stupnjevitog eliminiranja varijabli (*backward step-wise*) je model koji uz apsolutne vrijednosti dobivene mjerenjima, koristi i koeficijente 43 varijable, te konstante dobivene nakon statističke obrade 75 varijabli 15 morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara, 10706 jezgara makrofaga ispitivanih i kontrolnih stanica.

5. RASPRAVA

Bronhoalveolarno ispiranje (BAL) važna je metoda u dijagnostici sarkoidoze. Rutinskim pregledom svjetlosnim mikroskopom makrofagi u citocentrifugatima BAL-a ne variraju značajnije veličinom, osim multinuklearnih oblika. Jezgre makrofaga, pak različitog su oblika i veličine, od okruglastih do ovalnih, udubljenih i izduženih, rjeđe ih je više unutar jedne stanice, različite su strukture kromatina.

U ovom radu ispitivani su morfometrijski parametri jezgara makrofaga i karakteristike jezgara makrofaga statičkom DNA citometrijom u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkodozom i njihovo moguće dijagnostičko i kliničko značenje. Do sada je u literaturi opisan niz morfometrijskih i DNA parametara pretežno malignih stanica korisnih u dijagnostici; mali je broj studija na premalignim i benignim stanjima^{98,99}. U sarkoidozi su ispitivane morfometrijske i DNA karakteristike makrofaga i epiteloidnih stanica granuloma u bioptičkim uzorcima, ali ne u BAL-u^{74,101,102,103,104}.

Kriteriji za odabir bolesnika u ovom radu bili su u prvom redu adekvatnost BAL-a određena citološki, te povećani broj limfocita u staničnom sastavu, jer je limfocitni alveolitis jedna od pojavnih karakteristika sarkoidoze. Skupina ispitivanih bolesnika sa sarkoidozom podijeljena je na skupine sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika obzirom na razlike u kliničkim karakteristikama. Skupina bolesnika sa bolestima plućnog intersticija koje nisu sarkoidoza, ali sa limfocitnim alveolitisom u BAL-u, te skupina ispitanika bez plućne bolesti i normalnim brojem limfocita u BAL-u, poslužile su kao kontrolne skupine.

Među skupinama bolesnika i ispitanika nije bilo statistički značajne razlike po spolu, iako je u svim skupinama bilo više žena nego muškaraca. Statistički značajna razlika po spolu nađena je između bolesnika sa akutnom i kroničnom sarkoidozom. Žene su očekivano zastupljenije u skupini akutne sarkoidoze, dok su u skupini kronične sarkoidoze u ovom radu češće zastupljeni muškarci.

Ispitivane skupine bolesnika statistički značajno se razlikuju u dobi, radiološkom stadiju bolesti, postotku limfocita i omjeru CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita u BAL-u. Ove razlike su očekivane obzirom na kliničku sliku i važeće dijagnostičke kriterije pojedinih bolesti plućnog intersticija. Svi bolesnici sa sarkoidozom u ovom radu bili su radiološkog stadija 1 i 2, osim jednog u stadiju 3.

Objašnjenje za ovakvu distribuciju stadija u bolesnika sa sarkoidozom možemo objasniti kriterijem limfocitnog alveolitisa u ovom istraživanju, koji je u radiološkom stadiju 3 bolesti minimalan, ili ga nema^{19,42}.

Najveći broj bolesnika sa sarkoidozom radiološkog je stadija 1, što je u skladu sa podacima drugih^{19,51}. Radiološki stadij 2 obilježen je medijastinalno/hilarnom i plućnom zahvaćenošću, u ovom radu bio je očekivano češći u skupini kroničnih sarkoidoza, pa su i razlike u radiološkim stadijima akutne i kronične sarkoidoze statistički značajne.

Što je omjer CD4 i CD8 pozitivnih T limfocita viši, veća je i njegova specifičnost za dijagnozu sarkoidoze. Pod utjecajem je radiološkog stadija, rase bolesnika, spola i dobi^{39,43}. Hipersenzitivni pneumonitis, naročito njegovu akutnu formu karakterizira izrazito visoki postotak limfocita u BAL-u, omjer CD4/CD8 T limfocita bio je očekivano snižen ili u granicama normale^{39,106,107}. U ovom radu skupina bolesnika sa hipersenzitivnim pneumonitisom je među najzastupljenijim u skupini bolesti plućnog intersticija koje nisu sarkoidoza, što može objasniti ove razlike u omjeru CD4 i CD8 T limfocita. Ipak, u ovom radu nisu nađene statistički značajne razlike među bolesnicima sa akutnom i kroničnom sarkoidozom u postotku limfocita i omjeru CD4 i CD8 pozitivnih limfocita.

Među bolesnicima sa sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika nije bilo statistički značajne razlike obzirom na prisutnost ekstratorakalne sarkoidoze. U ovom radu bilježili smo prisutnost ekstratorakalnih promjena, ali ne i vrstu i lokalizaciju u literaturi opisanih promjena koje su udružene sa akutnom, odnosno kroničnom sarkoidozom^{1,2,3,19}.

U malog broja bolesnika sa sarkoidozom dijagnoza je postavljena bez mikroskopske morfološke potvrde, razlike između sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika očekivano nisu bile statističke značajne. Među ispitivanim skupinama bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika nađene su statistički značajne razlike obzirom na vrstu morfološke potvrde bolesti. U skupini sarkoidoza akutnog oblika češća je citološka mikroskopska morfološka potvrda bolesti što se može objasniti češćom medijastinalnom lokalizacijom i dostupnošću supstrata transbronhalno/transtrahealnoj punkciji tankom iglom^{3,19,49}. Slično, u skupini bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika, veći broj bolesnika imao je i citološku i

histološku potvrdu bolesti, jer su rutinski analizirani transbronhalni bioptat pluća i odgovarajući citološki otisak istog uzorka.

Istraživanje je pokazalo statistički značajne razlike među skupinama u jednostavnim morfometrijskim parametrima: površina, opseg, konveksnost, dužina i najveći polumjer jezgre makrofaga i to u svim statističkim varijablama (Pr, Med, Min, Max, SD), te u nekim varijablama jednostavnih parametara najmanji polumjer i debljina jezgre. Statistički značajne razlike među skupinama utvrđene su u nekim varijablama složenih morfometrijskih parametara: faktor oblika (FF), faktor izduženosti (FF izd) i omjer površine i konveksnosti (ACA), koji ne ovise o veličini stanice. Nađene su razlike između skupina bolesnika sa sarkoidozom i skupine bolesnika sa bolestima intersticija koje nisu sarkoidoza, skupine ispitanika bez plućne bolesti i skupina sa bolestima intersticija, ali ne i između skupina bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika. Standardna devijacija (SD) kao mjera varijabilnosti pokazala je razlikovno značenje među skupinama ovih morfometrijskih parametara: površina, opseg, faktor oblika (FF), faktor izduženosti (FF izd), konveksnost, debljina i najveći polumjer jezgara makrofaga. U ovom radu nisu nađene statističke značajne razlike varijabli ovih morfometrijskih parametara, uključujući standardnu devijaciju, između jezgara makrofaga bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika.

Statistički značajne razlike nađene su međutim, između svih ispitivanih skupina, pa tako i skupina bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika, u postotku makrofaga u S-fazi staničnog ciklusa određenog statičkom DNA citometrijom.

Površina jezgara makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom očekivano je statistički značajno veća nego u kontrolnoj skupini bez plućne bolesti, obzirom na prethodna saznanja o povećanoj metaboličkoj aktivnosti i proliferativnoj sposobnosti makrofaga^{61,63}. Burkhardt je u studiji uktrastrukturnih karakteristika pokazao da 40% većih jezgara makrofaga u BAL-u sadrži brojne vakuole i guste inkluzije koje povezuje sa povećanom metaboličkom aktivnošću⁶³. Površina jezgara je međutim manja u bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika nego u kontrolnoj skupini ne-sarkoidoza. Ove razlike mogu biti odraz različitosti u patogenezi, metaboličkoj i apoptotičkoj aktivnosti^{28,42,61,62}. Povećana standardna devijacija površine opisuje se kao objektivni kvantitativni parametar subjektivne procjene razlika u veličini jezgre stanice – anizokarioze⁶⁶. Prosjek standardnih devijacija (SD) površina jezgara kao mjera varijabilnosti najveći je u skupini bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika, jer reflektira najveće razlike u veličini makrofaga, koje

nisu uvijek vidjive rutinskim pretraživanjem, ali ne odvaja jezge makrofaga sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika.

Površina jezgara najveća je ipak u skupini ne-sarkoidoza. Radi se o raznolikoj skupini bolesti, poznatog i nepoznatog uzroka. U ovom radu nešto je zastupljenija skupina bolesti poznatog uzroka – 11 bolesnika sa hipersenzitivnim pneumonitisom, 6 bolesnika sa pneumonitisom izazvanim lijekovima i 1 sa pneumokoniozom – silikozom. Standardnim pretraživanjem makrofagi su veći, različite velične, citoplazme su izrazitije pjenušave, naročito u reakcijama na lijekove zbog nakupljanja lipidnog sadržaja, bez vidljivih razlika u veličini jezgara. Ovakav rezultat može se obasniti najvećom metaboličkom aktivnošću jezgara i posljedičnom citokinskom produkcijom makrofaga u ovoj skupini bolesti, u odnosu na skupine bolesnika sa sarkoidozom³⁹.

Slično, varijable **konveksne površine** jezgara makrofaga statistički značajno razlikuju sve skupine osim skupina bolesnika sa a sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika. Minimalne su razlike u prosječnim vrijednostima konveksne površine između sarkoidoza, ali je najveća varijabilnost i nepravilnost jezgara makrofaga, opisana najvećom prosječnom maksimalnom vrijednosti i standardnom devijacijom, u skupini jezgara makrofaga bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika. Ova morfometrijska varijabilnost i nepravilnost jezgara može se djelomično objasniti nalazom epiteloidnih stanica i epiteloidnim stanicama sličnih oblika u sarkoidozi kroničnog oblika. Jezgre epiteloidnih stanica karakteristično su izdužene do udubljene, u srednjem dijelu nešto tanje^{10,34}.

Opseg jezgara statistički značajno odvaja jezgre makrofaga u BAL-u skupina ispitanika bez bolesti i skupina bolesnika sa bolestima intersticija, osim prosjeka minimalnih vrijednosti. Također, kao kod površine i konveksnosti, prosjek standardnih devijacija i maksimalnih vrijednosti, kao pokazatelj varijabilnosti i nepravilnosti jezgara, viši je u skupini bolesnika sa sakroidozom kroničnog, u odnosu na sarkoidozu akutnog oblika.

Duljina, slično kao površina i konveksna površina statistički značajno diskriminira sve skupine osim skupina bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika. Iako nema razlika u prosječnim duljinama između jezgara makrofaga u sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika, vidljiva je veća varijabilnost duljina jezgara u skupini kronične sarkoidoze opisana većim prosjekom standardnih devijacija duljina.

Debljina je pokazala statistički značajne razlike među skupinama osim između sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika u prosjeku standardnih devijacija, maksimalnih i minimalnih vrijednosti. Vidljive razlike između akutne i kronične sarkoidoze, bez statističkih značajnosti, ipak se nađu u prosječnim standardnim devijacijama parametra debljine jezgara, kao još jedan dokaz mjerljive varijabilnosti jezgara makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika.

Najveći i najmanji polumjer rijetko su korišteni i opisivani morfometrijski parametri⁷⁸. To su najveći i najmanji polumjer kružnice opisane oko jezgre, najkraći polumjer do najbližeg ruba jezgre i najduži polumjer do najdaljeg ruba opisanog objekta, u ovom slučaju jezgre. Najveći polumjer u svim varijablama dobro razlikuje sve ispitivane skupine međusobno, osim skupina bolesnika sa sarkoidozama akutnog i kroničnog oblika. Sve varijable, međutim, veće su u jezgrama makrofaga u skupini kronične sarkoidoze u odnosu na sarkoidozu akutnog oblika. Ovo je očekivan nalaz ako se uzme u obzir da su ove jezgre nešto dulje i nepravilnije, kako je opisano duljinom, površinom i konveksnošću. Najmanji polumjer pokazuje statistički značajne razlike u prosjeku standardne devijacije i maksimalnim vrijednostima između ispitanika bez plućne bolesti i bolesnika sa bolestima plućnog intersticija. U savršeno postavljenim krugovima oko jezgara očekivala bi se jača razlikovna mogućnost ovog parametra, s mogućnošću postavljanja graničnih vrijednosti⁷⁰. Međutim, ispitivane jezgre postavljene su u poziciju za mjerenje uvijek na isti način, bez obzira na njihovu stvarnu planimetrijsku orijentaciju, pa je i manja mogućnost komparacije vrijednosti.

Površina, konveksnost, opseg, duljina, debljina, najveći i najmanji polumjer stanica i jezgara pokazale su diskriminativnu vrijednost, prema dosadašnjim podacima u literaturi, uglavnom u studijama koje su se bavile međusobnim razlikovanjem stanica malignih, te benignih i malignih promjena^{70,71,92,93,95,96}. Rezultati ovog istraživanja po prvi su pokazali vrijednost ovih parametara na stanicama koje nemaju maligni potencijal.

Razlike u obliku jezgara, odnosno stanica (polimorfizam) objektivno opisuju promjene **faktora oblika**, složenog parametra koji ne ovisi o apsolutnim izmjerenim veličinama^{70,99,101}. Standardnim citološkim pregledom svjetlosnim mikroskopom mogu se vidjeti varijacije oblika i izduženost pojedinih jezgara makrofaga, makrofaga sličnih epiteloidnim stanicama, do epiteloidnih stanica finijeg kromatina i sitnih kromocentara na svakom kraju^{39,50,47,108}. Tossi i sur. našli su prosječnu

graničnu vrijednost faktora oblika od 0,69 koja omogućuje razlikovanje epiteloidnih stanica granuloma u sarkoidozi i tuberkulozi¹⁰¹.

Prosječna vrijednost faktora oblika u ovom istraživanju ne razlikuje statistički značajno skupine ispitanika sa bolestima plućnog intersticija, vrijednosti su od 0,749 do 0,775. Ovako male razlike u prosječnim vrijednostima pripisujemo relativnoj uniformnosti oblika jezgara, bez većih odstupanja u populaciji subjektivnim metodama pretrage. Nalaz izduženih, ovalnih, uduljenih jezgara koje sličje epiteloidnim stanicama ne iskazuje se u postocima staničnog sastava određenog citološki, jer u broj ulaze i druge stanice – limfociti, neutrofilni i eoznofilni granulociti, plazma stanice i mastociti, ako ih ima. Cooker i sur. pokazali su također ograničeno značenje srednje vrijednosti faktora oblika u razlikovanju populacija malignih stanica limfoma visokog i niskog stupnja malignosti, jer se populacije stanica nisu morfološki znatnije razlikovale oblikom⁶⁸. Međutim, prosječni minimumi faktora oblika statistički su značajno niži u makrofagima svih skupina bolesnika sa bolestima intersticija u odnosu na skupinu bez bolesti, najmanji u skupini bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika. Prosječna minimalna vrijednost 0,387 faktora oblika makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika označava znatno odstupanje od savršenog oblika – kruga, opisuje prisutnost izduženih i nepravilnih jezgara, ali ne i njihov apsolutni broj. U prilog je ovoj tvrdnji i standardna devijacija (SD) parametra faktor oblika, najveća je u skupini bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika, bez statistički značajnih razlika među skupinama, ali odražava mjerljivu polimorfiju - pleomorfiju jezgara makrofaga^{66,70}. Bolja identifikacija i usporedba ovih oblika mogla bi se postići posebnim određivanjem staničnog sastava BAL-a, gdje bi se brojili samo makrofagi, a posebno bi se brojčano iskazao broj izduženih i udubljenih oblika jezgara koje odgovaraju određenim morfometrijskim parametrima.

Faktor izduženosti, kao omjer duljine i debljine, odnosno još jedan faktor oblika neovisan o veličini jezgre, u ovom radu pokazao je vrijednost u pronalaženju izduženih jezgara makrofaga. Najveću vrijednost u razlikovanju skupina ima, za razliku od faktora oblika, prosjek standardnih devijacija vrijednosti ovog parametra koji statistički značajno razlikuje sve skupine međusobno osim skupina sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika, iako je veći u skupini kronične sarkoidoze. U objavljenim studijama koje su se uglavnom bavile tumorskim stanicama, ovaj morfometrijski parametar nije pokazao samostalnu diskriminativnu funkciju⁷⁰, osim u razlikovanju keratoze, displazije i karcinoma pločastih stanica larinksa⁷¹.

Ispitali smo i vrijednost kompleksnog parametra koji uzima u obzir **odnos površine i konveksnosti** jezgre makrofaga (**ACA**), sličan faktoru ispunjenosti (*engl. fulness ratio*)^{70,71}. Obzirom da je konveksna površina – konveksnost u nepravilnijih jezgara sa puno sitnih usjeka veća od površine, ovaj omjer je to manji od 1 što je jezgra nepravilnija. ACA je pokazao statistički značajne razlike među svim skupinama osim akutne i kronične sarkoidoze u prosjeku standardnih devijacija. Prosjek je u skladu s ostalim rezultatima veći za jezgre makrofaga bolesnika sa kroničnom sarkoidozom.

U ovom radu provedena je i statička citometrijska analiza **DNA sadržaja** jezgara makrofaga BAL-a u bolesnika sa sarkoidozom. U literaturi nismo našli slične opisane studije. Utvrđene su statistički značajne razlike u postotku stanica u S-fazi staničnog ciklusa među svim skupinama ispitanika u ovom radu, pa tako i između skupina bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika. Statistički značajno se razlikuju skupine obzirom na distribuciju i tip histograma određen prema DNA indeksu (DI). Metoda Van Velthovena i sur.⁸⁴ za razliku od drugih metoda^{82,83,85} bolje opisuje promjene u DNA sadržaju proliferativnih stanja i ne-malignih stanica promijenjenih proliferacijskih sposobnosti, te je pogodnija za analizu makrofaga i primijenjena je u ovom radu. U aneuploidni tip, klasificirani su i tzv. gotovo-diploidni tipovi histograma (*engl. near-diploid*), kao što su hiperdiploidni i triploidni⁸⁴. Da bi se naglasila benignost stanica ovdje je upotrijebljen naziv ne-diploidni tipovi histograma, a triploidni/hipertriploidni češći je u bolesnika sa bolestima intersticija, dok je hiperdiploidni češći u zdravih ispitanika. Alveolarni makrofagi u BAL-u dobar su reprezentant zbivanja u plućima bolesnika sa sarkoidozom. U 2/3 bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika, kao i u skupini bolesnika sa bolestima intersticija koje nisu sarkoidoza nađen je triploidni/hipertriploidni tip histograma. Studija Kaysera i sur. pokazala je da makrofagi koji se nađu u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom dijelom potječu iz sarkoidnih granuloma i to u jednakom postotku, neovisno o starosti granuloma i stadiju bolesti⁴². Tome je u prilog i statistički značajno češća učestalost radiološkog stadija 1 u bolesnika sa akutnom sarkoidozom u našem radu, u kojem nema plućne zahvaćenosti bolešću, a jednaka je zastupljenost triploidno/hipertriploidnog tipa histograma kao i u sarkoidozi kroničnog oblika. Također, u svih ispitanika u ovom radu postotak stanica u S-fazi viši je od normalnih raspona i kreće se od gotovo 7 do 16,6 %. Statistički značajne razlike u postocima stanica u S-fazi nađene su i između bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika. Pretežno aneuploidni tip histograma opisan je u radovima drugih na normalnim tkivima sa izraženom proliferativnom aktivnošću, kao

što je dojka i želudac⁹⁹, epiteloidnim stanica u sarkoidnim granulomima^{102,103,104}, te hiperplastičnim i prekanceroznim stanjima^{97,99,100}. Makrofagi u BAL-u sekretorno su aktivni, značajnija sekretorna i metabolička aktivnost morfološki je ultrastrukturalno dokazana prvenstveno u sarkoidozi^{61,63}. Uz povećanu proliferaciju, sarkoidozu karakterizira i smanjena apoptoza, a rezultat je akumulacija i produženo preživljenje T pomagačkih limfocita i aktiviranih makrofaga²⁸.

Razlike u postotku jezgara makrofaga pojedinih dijelova DNA histograma u ovom radu pokušali smo objasniti i razlikama u apoptotičkoj aktivnosti sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika opisanim u brojnim studijama^{14,15,16,17,18}. Metodom prema Van Velthovenu⁸⁴, svi DNA histogrami jezgara makrofaga u ovom istraživanju su nediploidni: hiperdiploidni i triploidni/hipertriploidni, pa i u ispitanika bez plućne bolesti. Modifikacija analize histograma prema Kardum primijenjena je na pretežno diploidne, „uske“, unimodalne histograme⁷⁸, te iako je primijenjena na maligne stanice, dobiveni histogrami u ovom radu dodatno su analizirani i na ovaj način. Ovom modifikacijom našli smo da je najmanji postotak stanica u vršku histograma od svih skupina upravo u skupini akutne sarkoidoze, ali razlike nisu statističke značajne. U skupini bolesnika sa kroničnom sarkoidozom viši je postotak stanica u vršku i prije vrška u odnosu na skupinu akutne sarkoidoze, također su u skupini kroničnih sarkoidoza najviši postoci stanica prije vrška, a najmanji poslije vrška u odnosu na ostale skupine, ali bez statistički značajnih razlika među skupinama. Ovakva raspodjela pojedinih frakcija DNA histograma može se objasniti smanjenom i inaktivnom apoptozom u svih bolesnika sa sarkoidozom, jer je dio stanica zadržan u fazi mirovanja, uz održanu povećanu proliferaciju, kao i razlikama u apoptotičkoj i proliferativnoj aktivnosti između akutne i kronične sarkoidoze. Većina dokaza objavljenih studija govori o poremećenoj apoptozi u sarkoidozi, većinom inaktivaciji apoptotičkih puteva^{22,28}. Tako je ekspresija antiapoptotičkog bcl-2 proteina visoka u limfocitima koji okružuju granulome bolesnika sa sarkoidozom, ali i BAL limfocitima i makrofagima u aktivnih sarkoidoza¹⁴. Ekspresija proapoptotičkog Fas liganda i receptora viša je u makrofagima bolesnika sa sarkoidozom za razliku od bolesnika sa plućnom fibrozom i karcinomom pluća, te u kroničnoj sarkoidozi za razliku od akutne sarkoidoze^{14,15,18}. Usprkos povećanoj Fas ekspresiji, BAL limfociti bolesnika sa sarkoidozom rezistentni su na indukciju apoptoze, što može pogodovati nakupljanju upalnih stanica u plućima, održavanju upale, razvoju i perzistenciji granuloma¹⁶. Produženje upale u kroničnoj sarkoidozi modulirano je i specifičnim citokinima, kao što su IL-8, TGF- α i INF- γ koji podržavaju upalu i formiranje granuloma, njihovo povlačenje vodi do indukcije apoptoze, a dodatno i same apoptotičke stanice mogu proizvoditi

imunomodulatorne faktore, kao što su IL-10 i TGF- β , koji sudjeluju u rezoluciji granuloma bolesti¹⁷. Ovi spoznajama možemo djelomično objasniti nalaz manje, ali još uvijek povećane proliferativne aktivnosti, uz povećanu apoptozu statičkom DNA citometrijskom analizom u makrofaga bolesnika sa sarkoidozom kroničnog početka, koji imaju rjeđu spontanu remisiju. Za precizne zaključke trebalo bi provesti statičku DNA citometriju, ispitivanje ekspresije gena uključenih u apoptozu i mjerenje citokinske aktivnosti na istom uzorku bolesnika sa sarkoidozom.

Ovo istraživanje pokazalo je postojanje izdvojenih morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara koji razlikuju jezgre makrofaga u BAL-u bolesnika sa akutnom i kroničnom sarkoidozom, ali ih samo postotak stanica u S-fazi odvaja sa statističkom značajnošću.

U skladu sa navedenim, očekuju se i mjerljive promjene u morfologiji jezgara makrofaga u sarkoidozi, kao i razlike između akutne samoograničavajuće i kronične, aktivne, prolongirane sarkoidoze. Na osnovu distribucije varijabli morfometrijskih i denzitometrijskih parametara jezgara makrofaga u našem istraživanju, pokušali smo identificirati morfološke karakteristike pojedinih skupina bolesnika sa akutnom i kroničnom sarkoidozom na osnovu objektivnih, mjerljivih parametara jezgara makrofaga u BAL-u.

Skupinu bolesnika sa **sarkoidozom akutnog oblika** morfometrijski karakteriziraju velike, pretežno ovalne, uniformne jezgre makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku. Jezgre ovih stanica su ne-diploidnih karakteristika, sa statistički značajno većom proliferativnom aktivnošću, ali je pretpostavljena i smanjena apoptotička aktivnost. Opisuju ih najveći medijani debljine, najmanji prosjeci vrijednosti omjera površine i konveksnosti, najveće prosječne i maksimalne vrijednosti najmanjeg polumjera, te najmanja prosječna vrijednost faktora izduženosti. Analiza DNA sadržaja pokazala je najveći postotak stanica histograma u S-fazi koji se statistički značajno razlikuje, najveći postotak u G2-M fazi staničnog ciklusa, a najmanji postotak stanica u vršku u odnosu na ostale ispitivane skupine. DI se ne razlikuje među sarkoidozama i uglavnom je triploidan/hipertriploidan u 2/3 ispitanika.

Kronična sarkoidoza, s druge strane, obilježena je najvećom polimorfijom jezgara makrofaga, s nalazom elipsoidnih, izduženih jezgara. Jezgre stanica su ne-diploidnih karakteristika, proliferativna aktivnost je statistički značajno manja, ali još uvijek viša od granične vrijednosti, a apoptotička aktivnost smanjena. Opisuju ih

najveće prosječne vrijednosti standardnih devijacija površine, opsega, konveksnosti, debljine, FF i FF_{izd}, ali i najveći prosjek minimalnih vrijednosti FF. DNA analizom nađen je najveći postotak stanica prije vrška histograma, a najmanji poslije vrška histograma, a postotak stanica u S-fazi je iznad normalnog raspona, ali statistički značajno manji od postotka S-faze makrofaga akutne sarkoidoze i bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza. DI je triploidan/hipertriploidan u 2/3 ispitanika kao i u akutnoj sarkoidozi.

Istraživanje je dalje pokazalo postojanje **skupine varijabli** morfometrijskih, DNA citometrijskih i kliničkih pokazatelja/parametara koje omogućuju razlikovni kriterij za dijagnozu akutne, odnosno kronične sarkoidoze međusobno, te u odnosu na skupinu ispitanika bez bolesti i skupinu bolesnika sa bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza. Niz od 43 varijable ispitivanih pokazatelja/parametara omogućuje potpuno razlikovanje (100%) jezgara makrofaga ispitanika svih skupina bolesti. Uključena je većina varijabli svih 10 ispitivanih morfometrijskih parametara jezgara makrofaga: površina (medijan, minimum, maksimum i SD), opseg (minimum, maksimum i SD), faktor oblika (FF) (prosjek, medijan, maksimum i SD), faktor izduženosti (FF_{izd}) (prosjek, medijan, minimum), konveksnost (medijan, minimum, maksimum i SD), površina/konveksnost (ACA) (prosjek, minimum, maksimum, SD), duljina (prosjek, minimum, SD), debljina (prosjek, medijan, minimum, maksimum i SD), najmanji polumjer (medijan, minimum, maksimum, SD), najveći polumjer (prosjek, minimum, maksimum i SD). Od DNA citometrijskih parametara razlikovno značenje pokazale su sve ispitivane varijable: % stanica prije vrha, u vrhu i poslije vrha histograma, te % stanica u S-fazi i G₂M fazi staničnog ciklusa.

U ovom radu morfometrijska analiza jezgara makrofaga provedena je na citocentrifugatima tekućih uzorka – bronhoalveolarnih ispiraka, koji su nakon standardnog bojanja metodom May-Grünwald –Giemsa (MGG) odbojeni i ponovno obojani. Sušenje na zraku koje se koristi za fiksiranje pri MGG bojenju rezultira u povećanju površine jezgara od 58% u odnosu na nefiksirane, nativno mjerene jezgre. Druge tehnike bojanja koje koriste alkoholnu fiksaciju, kao bojanje po Papanicolaou dovode do smanjenja površine jezgre i do 50% u donosu na nefiksirane, neobojene stanice⁶⁶. Tako, ovisno o tehnici fiksacije i bojanja stanica, apsolutne vrijednosti površine iste stanice mogu se razlikovati i preko 100%.

Klasifikacijske funkcije – koeficijenti i konstante koje na osnovu prosječnih vrijednosti varijabli pojedinih parametara svrstavaju jezgre makrofaga

bronhoalveolanih ispiraka u određenu skupinu bolesnika sa sarkoidozom mogu predstavljati dodatni dijagnostički kriterij. Koristi se izračun koji je suma umnožaka i ne ovisi samo o apsolutnim vrijednostima. Na ovaj način možemo razlikovati i sarkoidozu od bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza, a također se prezentiraju povećanim brojem limfocita u BAL-u.

Pretpostavljamo da se dobivene klasifikacijske funkcije mogu upotrijebiti za morfometrijsku analizu populacija jezgara makrofaga BAL-a u citocentrifugatima koji su drugačije fiksirani i obojani drugim standardnim bojanjima (po Papanicolaou).

Ovo istraživanje stoga ukazuje da je morfologija jezgara makrofaga u BAL-u bolesnika sa sarkoidozom dobar reprezentant zbivanja u sarkoidnim granulomima, te može objektivno doprinjeti dijagnostičkom algoritmu razlikovanja sarkoidoza akutnog i kroničnog oblika.

Dalje, klinički različiti oblici sarkoidoza – s akutnim i primarno kroničnim početkom, različiti su i prema istraženim parametrima, što ukazuje na različitu patogenezu i možda prognozu. Rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti za daljnje studije o aktivnosti i ponašanju ove bolesti.

6. ZAKLJUČCI

Razmatrajući rezultate ovog istraživanja, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Utvrđene su statistički značajne razlike među skupinama ispitanika u svim varijablama (Pr, Med, SD, Max, Min) morfometrijskih parametara površina, opseg, konveksitet, dužina i najveći polumjer jezgara makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku.
2. Utvrđene su statistički značajne razlike u postotku makrofaga u S-fazi staničnog ciklusa u bronhoalveolarnim ispicima među skupinama bolesnika sa sakroidozom akutnog i kroničnog oblika.
3. Skupinu bolesnika sa sarkoidozom akutnog oblika morfometrijski karakteriziraju velike, pretežno ovalne, uniformne jezgre makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku. Jezgre ovih stanica su ne-diploidnih karakteristika, sa statistički značajno većom proliferativnom aktivnošću i pretpostavljenom smanjenom apoptotičkom aktivnošću.
4. Skupina bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika obilježena je najvećom polimorfijom jezgara makrofaga, s nalazom elipsoidnih, izduženih jezgara. Jezgre stanica su ne-diploidnih karakteristika, proliferativna aktivnost je statistički značajno manja, ali još uvijek viša od granične vrijednosti, uz pretpostavljenu smanjenu apoptotičku aktivnost.
5. Multivarijatnom diskriminativnom analizom uz korištenje stupnjevito eliminiranja varijabli izdvojene su 43 varijable morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara jezgara makrofaga bronhoalveolarnih ispiraka koje omogućuju 100% razlikovanje bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika.

6. Multivarijatnom diskriminativnom analizom dobivene su klasifikacijske funkcije koje na osnovu prosjeka vrijednosti 43 varijable pojedinih parametra, te pripadajućih koeficijenata i konstanti, omogućuju izračun sume umnožaka i svrstavanje populacija jezgara makrofaga bronhoalveolanih ispiraka bolesnika u skupinu sarkoidoze akutnog, odnosno sarkoidoze kroničnog oblika.

7. SAŽETAK

Bronhoalveolarno ispiranje (BAL) važna je metoda u dijagnostici sarkoidoze. Akutni i kronični pojavni oblik sarkoidoze razlikuju se prema kliničkim pokazateljima i tijeku bolesti. Rutinskim pregledom svjetlosnim mikroskopom jezgre makrofaga u citocentrifugatima BAL-a bolesnika sa sarkoidozom različitog su oblika i veličine, od okruglastih do ovalnih, udubljenih i izduženih, rjeđe ih je više unutar jedne stanice, različite su strukture kromatina.

U ovom radu ispitivani su morfometrijski parametri jezgara makrofaga i karakteristike jezgara makrofaga statičkom DNA citometrijom u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika i njihovo dijagnostičko i kliničko značenje. Ispitivani parametri jezgara makrofaga su jednostavni morfometrijski parametri: površina, opseg, konveksnost, duljina, debljina, najveći polumjer, najmanji polumjer; složeni morfometrijski parametri: faktor oblika (FF), faktor izduženosti (FF izd) i površina/konveksnost (ACA); te DNA indeks (DI), postoci stanica prije vrha histograma, u vrhu, poslije vrha, u S-fazi i G2M fazi DNA histograma jezgara. U ispitivanje su uključena 73 ispitanika podijeljena u 4 skupine: bolesnici sa sarkoidozom akutnog oblika (n=16), sarkoidozom kroničnog oblika (n=17), intersticijskom bolesti pluća koja nije sarkoidoza (n=30), te ispitanici bez plućne bolesti (n=10).

U bronhoalveolarnom ispirku utvrđene su statistički značajne razlike među skupinama ispitanika u svim varijablama morfometrijskih parametara površina, opseg, konveksitet, dužina i najveći polumjer jezgara makrofaga ($p < 0,05$).

Statistički značajne razlike među skupinama ($p < 0,05$) utvrđene su također u varijablama Max i SD najmanjeg polumjera jezgara, Max, Min i SD debljine jezgara, Pr, Max, Min i SD omjera površine i konveksnosti jezgara, Max i Min faktora oblika (FF), Pr, Med, Max i i SD faktora izduženosti (FF izd), te u denzitometrijskom određivanju DNA sadržaja jezgara makrofaga - postotku jezgara u S-fazi staničnog ciklusa, te u DNA indeksu (DI) određenom metodom po VanVelthovenu.

Utvrđene su statistički značajne razlike u postotku stanica u S-fazi staničnog ciklusa među skupinama bolesnika sa akutnom i kroničnom sarkoidozom ($p < 0,05$).

Skupinu bolesnika sa sarkoidozom akutnog oblika morfometrijski karakteriziraju velike, pretežno ovalne, uniformne jezgre makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku. Jezgre ovih stanica su ne-diploidnih karakteristika, sa statistički značajno većom proliferativnom aktivnošću, ali pretpostavljenom smanjenom apoptotičkom aktivnošću.

Skupina bolesnika sa sarkoidozom kroničnog oblika obilježena je najvećom polimorfijom jezgara makrofaga, s nalazom elipsoidnih, izduženih jezgara. Jezgre stanica su ne-diploidnih karakteristika, proliferativna aktivnost je statistički značajno manja, ali još uvijek viša od granične vrijednosti, uz pretpostavljenu smanjenu apoptotičku aktivnost.

Multivarijatnom diskriminativnom analizom uz korištenje stupnjevitog eliminiranja varijabli izdvojene su 43 varijable morfometrijskih i DNA citometrijskih parametara jezgara makrofaga bronhoalveolarnih ispiraka koje omogućuju 100% razlikovanje bolesnika sa sarkoidozom akutnog i kroničnog oblika. Ove varijable možemo koristiti za diferencijalnu dijagnozu sarkoidoze i bolesti intersticija koje nisu sarkoidoza, a također se prezentiraju povećanim brojem limfocita u BAL-u.

Multivarijatnom diskriminativnom analizom dobivene su klasifikacijske funkcije koje na osnovu prosjeka vrijednosti 43 varijable pojedinih parametara, pripadajućih koeficijenata i konstanti, omogućuju izračun sume umnožaka i svrstavanje populacija jezgara makrofaga bronhoalveolarnih ispiraka bolesnika u skupinu sa sarkoidozom akutnog, odnosno sarkoidozom kroničnog oblika.

Title:

Morphometry and statical DNA cytometry of macrophages in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis

8. SUMMARY

Bronchoalveolar lavage (BAL) is important procedure in diagnosis of sarcoidosis. The onset of sarcoidosis can be acute or chronic, with different clinical characteristics and prognosis. Macrophages nuclei in BAL fluid smears of patients with sarcoidosis differ in shape and size from round to oval, indented to slender, rarely more than one in single macrophage, with variations in chromatin structure.

Morphometric parameters of the macrophages nuclei, as well as image cytometric DNA analysis n BAL fluid of patients with acute and chronic onset of sarcoidosis have been investigated in other to establish their diagnostic and clinical significance. Investigated morphometric parameters were: area, outline, convex area, length, breadth, maximal radius, minimal radius, form factor (FF), elongation factor (EF), area/convex area (ACA), DNA index (DI), percentage of cells before histogram peak, percentage of cells in peak, percentage of cells after histogram peak, percentage of cells in S-phase and G2M phase. Seventy-three patients were included in the investigation, separated in four groups: sarcoidosis with acute onset (n=16), sarcoidosis with chronic onset (n=17), interstitial lung diseases other then sarcoidosis (n=30) and controls (n=10).

Statistical significant differences were observed between groups in all statistical descriptions of morphometric parameters area, outline, convex area, length and maximal radius of the macrophages nuclei in BAL fluid ($p < 0,05$).

Statistical significant differences between groups ($p < 0,05$). were observed in statistical descriptions Max and SD of the minimal radius; lenght Max, Min and SD; area/convex area (ACA) Mean, Max, Min and SD; form factor (FF) Max and Min; elongation factor (EA) Mean, Med, Max and SD, and in DNA cytometric analysis of macrophages nuclei in percantage of cells in S-phase and DNA index (DI) determined with Van Velthoven method.

Statistical significant differences were found in percentage of the cells in S-phase between patients with acute and chronic sarcoidosis determined with DNA cytometric analysis of BAL fluid.

Sarcoidosis patients with acute onset of the diseases in our investigation had large, predominant oval, uniform macrophages nuclei in BAL fluid, non-diploid, with statistically significant higher proliferative activity and decreased apoptotic activity.

Sarcoidosis patients with chronic onset of the diseases in our investigation had most prominent anisonucleosis of macrophages nuclei, with elongated, slender forms, non-diploid, with statistically significant lower proliferative activity, but still higher than in controls, and with lower apoptotic activity.

Forward step-wise method in multivariate discriminant function analysis revealed variables allowing 100% separation of sarcoidosis patients with acute and chronic sarcoidosis. In all, 43 variables of morphometric and DNA cytometric parameters of macrophages nuclei in BAL fluid have been separated. These variables can be also used for differential diagnosis of sarcoidosis and interstitial lung diseases other than sarcoidosis with lymphocytic alveolitis.

Multivariate discriminant forward step-wise analysis resulted in classification functions for investigated groups. These classification functions can be combined with mean values of 43 variables of investigated morphometric parameters and constants for each group of patients, allowing correct classification of BAL fluid macrophages nuclei in acute or chronic sarcoidosis.

9. LITERATURA:

- ¹ Judson MA. Sarcoidosis: Clinical Presentation, Diagnosis, and Approach to Treatment. *Am J Med Sci* 2008;335:26-33.
- ² ATS/ERS/WASOG Statement on Sarcoidosis: GW Hunninghake, U Costabel, M Ando, R Baughman, JF Cordier, R du Bois, A Eklund, J Linch, G Rizzato, C Rose, O Selroos, OP Sharma. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999;16:149-174.
- ³ Peroš-Golubičić T. Sarkoidoza: klinička slika i dijagnostički postupak. U: Peroš-Golubičić T, ur. *Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 171-187.*
- ⁴ Alilović M, Peroš-Golubičić T, Tekavec-Trkanjec J, Smojver-Ježek S, Liščić R. Epidemiological Characteristics of Sarcoidosis Patients Hospitalized in the University Hospital for Lung Diseases "Jordanovac" in the Period 1997-2002. *Coll Antropol* 2006; 30:315-319.
- ⁵ Alilović M. Epidemiologija sarkoidoze. U: Peroš-Golubičić T, ur. *Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 165-170.*
- ⁶ Peroš-Golubičić T. Bolesti plućnog intersticija: UVOD. U: Peroš-Golubičić T, ur. *Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 1-18.*
- ⁷ Rybicki BA, Hirst K, Iyengar SK, Barnard JG, Judson MA, Rose CS, Donohue JF, Kavuru MS, Rabin DL, Rossman MD, Baughman RP, Elston RC, Maliarik MJ, Moller DR, Newman LS, Tierstein AS, Iannuzzi MC. A sarcoidosis genetic linkage consortium: the sarcoidosis genetic analysis (SAGA) study. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2005; 22:115-122.
- ⁸ Grubić Z, Zunec R, Peros-Golubicic T, Tekavec-Trkanjec J, Martinez N, Alilovic M, Smojver-Jezek S, Kerhin-Brkljacic . HLA class I and class II frequencies in patients with sarcoidosis from Croatia: role of HLA-B8, DRB1*0301, and DQB1*0201 haplotype in clinical variations of the disease. *Tissue Antigens* 2007;70:301-306.
- ⁹ Moller DR. Potential Etiologic Agents in Sarcoidosis. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:465-468.
- ¹⁰ Reynolds HJ. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:250-63.
- ¹¹ Sharma OP. What causes sarcoidosis? U: Peroš-Golubičić T, ur. *Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 140-147.*

-
- ¹² Rothkrantz-Kos S, Drent M, van Dieijen-Visser MP. Molecular changes and immunology of sarcoidosis. U: Peroš-Golubičić T, ur. Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 148-152.
- ¹³ Grunewald J, Eklund A. Role of CD4⁺ T Cells in Sarcoidosis. Proc Am Thorac Soc 2007;4:461-464.
- ¹⁴ Ozdemir OK, Celik G, Dalva K, Ulger F, Elhan A, Beksac M. High CD95 expression of BALF lymphocytes predicts chronic course in patients with sarcoidosis. Respirology 2007; 12:869-873.
- ¹⁵ Domagala-Kulawik J, Droszcz P, Kraszewska I, Chazan R. Expression of Fas antigen in the cells form bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Folia Histochem et Cytobiol 2000; 38:185-188.
- ¹⁶ Stridh H, Planck A, Gigliotti D, Eklund A, Grunewald J. Apoptosis resistant bronchoalveolar lavage (BAL) fluid lymphocytes in sarcoidosis. Thorax 2002; 57:897-901.
- ¹⁷ Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. Apoptosis 2006; 11:1709-1726.
- ¹⁸ Dai H, Guzman J, Costabel U. Increased expression of apoptotic signalling receptors by alveolar macrophages in sarcoidosis. Eur Respir J 1999; 13:1451-1454.
- ¹⁹ Peroš-Golubičić T. Osobitosti i ishod plućne sarkoidoze. Liječ Vjesn 1993; 115:293-298.
- ²⁰ Rothkrantz-Kos S, van Dieijen-Visser MP, Mulder PGH, Drent M. Potential Usefulness of Inflammatory Markers to Monitor Respiratory Functional Impairment in Sarcoidosis. Clin Chem 2003; 49: 1510-2003.
- ²¹ Mažuranić I. Radiološka obradba pluća. U: Peroš-Golubičić T, ur. Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 27-45.
- ²² Dubaniewicz A, Trzonkowski P, Dubaniewicz-Wybieralska M, Dubaniewicz A, Singh M, Myśliwski A. Comparative Analysis of Mycobacterial Heat Shock Proteins-Induced Apoptosis of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Sarcoidosis and Tuberculosis. J Clin Immunol 2006;3:243-250.
- ²³ Kunitake R, Kuwano K, Miyazaki H, Hagimoto N, Nomoto Y, Hara N. Apoptosis in the course of granulomatous inflammation in pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J 1999; 13:1329-1337.
- ²⁴ Häcker G. The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res 2000;301:5-17.
- ²⁵ Hail N, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. Apoptosis 2006;11:889-904.

-
- ²⁶ Mermigkis C, Polychronopoulos V, Mermigkis D, Tsakanika K, Heretis M, Karagianidis N, Bouros D. Overexpression of Bcl-2 Protein in Bronchoalveolar Lavage Lymphocytes and Macrophages in Sarcoidosis. *Respiration* 2006; 73:221-226.
- ²⁷ Cree IA, Nurbhai S, Milne G, Swanson Beck J. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. *J Clin Pathol* 1987; 40:1314-1319.
- ²⁸ Petzmann S, Maercker C, Markert E, Kern I, Osolnik K, Pohl W, Popper HH. Enhanced proliferation and decreased apoptosis in lung lavage cells of sarcoidosis patients. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006; 23:190-200.
- ²⁹ Xaus J, Besalduch N, Comalada M, Marcoval J, Pujol R, Mana J, Celada A. High expression of p21^{Waf1} in sarcoid granulomas: a putative role for long-lasting inflammation. *J Leukoc Biol* 2003; 74:295-301.
- ³⁰ Rutherford RM, Kehren J, Staedtler F, Chibout SD, Egan JJG, Tamm M, Gilmartin JJ, Brutsche MH. Functional genomics in sarcoidosis – reduced or increased apoptosis? *Swiss Med WKLY* 2001; 131:459-470.
- ³¹ Lappi-Blanco E, Soini Y, Pääkkö P. Apoptotic Activity is Increased in the Newly Formed Fibromyxoid Connective Tissue in Bronchiolitis Obliterans Organizing Pneumonia. *Lung* 1999;177:367-376.
- ³² Kunitake R, Kuwano K, Miyazaki H, Kawasaki M, Hagimoto N, Fujita M, Kaneko Y, Hara N. Expression of p53, p21 (Waf1/Cip1/Sdi1) and Fas antigen in collagen vascular and granulomatous lung diseases. *Eur Respir J* 1998; 12:920-925.
- ³³ Shikuwa C, Kadota J, Mukae H, Iwashita T, Kaida H, Ishii H, Ishimatsu Y, Kohno S. High Concentrations of Soluble Fas Ligand in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Pulmonary Sarcoidosis. *Respiration* 2002; 69:242-246.
- ³⁴ Tekavec Trkanjec J, Peroš-Golubičić T, Smojver-Ježek S, Alilović M. Bronhoalveolarna lavaža. *Liječ Vjesn* 2003;125:145-50.
- ³⁵ Tekavec-Trkanjec J. Bronhoskopija. U: Peroš-Golubičić T, ur. *Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija*: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 46-61.
- ³⁶ Klech H, Pohl W. (ed.) Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989;2:561-585.
- ³⁷ ERS Task Force. Guidelines for measurement of acellular components and recommendations for standardization of bronchoalveolar lavage (BAL). *Eur Respir Rev* 1999;9:25-157.

-
- ³⁸ Smojver-Ježek S. Citološke pretrage upalnih bolesti plućnog parenhima. U: Peroš-Golubičić T, Pavlović M, voditelji tečaja. Tuberkuloza, pneumonija, pneumonitis – upalne bolesti plućnog parenhima : poslijediplomski tečaj stalnog usavršavanja liječnika I. kategorije, Zagreb, 17.-19. travnja 2002. Zagreb : Medicinska naklada; 2002. p. 35-41. (Biblioteka stalnog medicinskog usavršavanja) (Poslijediplomski tečaj stalnog usavršavanja liječnika I. kategorije).
- ³⁹ Costabel U, Guzman J. Broncholaveolar lavage in interstitial lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2001;7:255-261.
- ⁴⁰ Guzman J, Costabel U. Bronchoalveolar Lavage in Diagnostic Cytology. In: Wied GL, Keebler CM, Koss LG, Patten SF, Rosenthal DL, ed. *Compendium on Diagnostic Cytology: Tutorials of Cytology*, Chicago, 1992. str. 251-265.
- ⁴¹ Costabel U, Ohshimo S, Guzman J. Diagnosis of sarcoidosis. *Curr Opin Pulm Med* 2008;14:455-461.
- ⁴² Kayser K, Hagemeyer O. Stage related morphometry of sarcoid granulomas and inflammatory cell types in bronchoalveolar lavage. *Anal Cell Pathol* 1991; 335-342.
- ⁴³ Reichenberg F, Kleiber B, Baschiera B, Bubendorf L, Brutsche M, Dalquen P, Tamm M. Bronchoalveolar lavage quality influences the T4/T8 ratio in sarcoidosis. *Respir Med* 2007;101:2025-2030.
- ⁴⁴ Peroš-Golubičić T. Idiopatske intersticijske pneumonije (IIP). U: Peroš-Golubičić T, ur. *Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija*: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 248-258.
- ⁴⁵ Drent M, Jacobs JA, de Vries J, Lamers RJS, Leim IH, Wouters EFM. Does the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile reflect the severity of sarcoidosis? *Eur Respir J* 1999;13:1338-1344.
- ⁴⁶ Križanac Š. Patohistološka analiza bioptičkog uzorka pluća. U: Peroš-Golubičić T, ur. *Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija*: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 62-71.
- ⁴⁷ Smojver-Ježek S, Pongrac I, Peroš-Golubičić T, Tekavec-Trkanjec J, Gredelj Nj. Cytology of BAL and transbronchial lung biopsy imprints in the interstitial lung diseases other than sarcoidosis. In: *29th European Congress of Cytology, 2003 Oct 5-8; Prague: abstract book*. Prague: Univerzita Karlova v Praze. Nakladatelstvi Karolinum; 2003. p.151.

-
- ⁴⁸ Smojver-Ježek S. Transbronhalna/transtrahealna aspiracijska punkcija u dijagnostici intratorakalne limfadenopatije. U: Peroš-Golubičić T, ur. Sarkoidoza / bolesti plućnog intersticija: Medicinska naklada, Zagreb, 2005. str. 72-85.
- ⁴⁹ Smojver-Ježek S, Peroš-Golubičić T, Tekavec-Trkanjec J, Mažuranić I, Alilović M. Transbronchial fine needle aspiration cytology in the diagnosis of mediastinal/hilar sarcoidosis. *Cytopathology* 2007;18:3-7.
- ⁵⁰ Peroš-Golubičić T, Sharma O, editors: Definition, Classification and Clinical Features. In: *Clinical Atlas of Interstitial Lung Disease*, Springer-Verlag London, 2006; 7-17
- ⁵¹ Costabel U. Sarcoidosis: clinical update. *Eur Respir J* 2001; 18 (suppl 32): 56s-68s.
- ⁵² El-Zammar OA, Katzenstein A-LA. Pathological diagnosis of granulomatous lung diseases: a review. *Histopathology* 2007;50:289-310.
- ⁵³ Tekavec Trkanjec J, Peroš-Golubičić T, Grozdek D, Ivičević A, Alilović M. The role of transbronchial lung biopsy in the diagnosis of solitary pulmonary nodule. *Coll Antropol* 2003;27:669-75.
- ⁵⁴ Hayakawa H, Shirai M, Sato A, Yoshizawa Y, Todate A, Imokawa S, Suda T, Chida K, Tamura R, Ishihara K, Saiki S, Ando M. Clinicopathological features of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Respirology* 2002;7:359-364.
- ⁵⁵ Mohr LC. Hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* 2004;10:401-411.
- ⁵⁶ Martinez FJ, Keane MP. Update in Diffuse Parenchymal Lung Diseases 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1066-1071.
- ⁵⁷ Travis WD, King TE, Bateman E et al. ATS/ERS International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J of Respir Crit Care Med* 2002; 165:277-304.
- ⁵⁸ Brain JD. Mechanisms, Measurement, and Significance of Lung Macrophages Function. *Envir Health Perspect* 1992;97:5-10.
- ⁵⁹ Triggiani M, Giannattasio G, Balestrieri B, Loffredo S, Forte V, Granat F. Phenotypical and functional heterogeneity of human lung macrophages. *Clin Exp All rev* 2004;4:129-134.
- ⁶⁰ Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7: 1678-1689.
- ⁶¹ Danel C, Dewar A, Corin B, Turner-Warwick M, Chretien J. Ultrastructural Changes in Bronchoalveolar Lavage Cells in Sarcoidosis and Comparison With the Tissue Granuloma. *Am J Pathol* 1983;112:7-17.

-
- ⁶² Krombach F, Gerlach JT, Padovan C, Burges A, Behr J, Beinert T, Vogelmeier C. Characterization and quantification of alveolar monocyte-like cells in human chronic inflammatory lung disease. *Eur Respir J* 1996;9:984-991.
- ⁶³ Burkhardt O, Lode H, Welte T, Merker HJ. Ultrastructural types of alveolar macrophages in bronchoalveolar lavages from patients with pulmonary sarcoidosis. *Micron* 2007;38:572-579.
- ⁶⁴ Oberholzer M, Christen H, Ettl R, Buser M, Oestereicher M, Gschwind R. Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on a simple, multipurpose analysis system. *Analyt Quant Cytol Histol* 1991;13:316-20.
- ⁶⁵ Baak JPA, Wisse-Brekemans ECM, Langley FA, Talerman A, Delemarre JFM. Morphometric data to FIGO stage and histological type and grade for prognosis of ovarian tumours. *J Clin Pathol* 1986; 39: 1340-6.
- ⁶⁶ Van Diest PJ, Baak JPA. Morphometry. In: Bibbo M. *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia:W.B. Saunders Company; 1991.p. 946-64.
- ⁶⁷ Baak JPA. The Principles and Advances of Quantitative Pathology. *Anal Quant Cytol Histol* 1985;9: 89-95.
- ⁶⁸ Crocker J, Jones EL, Curran RC. A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. *J Clin Pathol* 1983; 36(3): 298-302.
- ⁶⁹ Crocker J, Jones EL, Curran RC. The form factor of alpha-naphthyl acetate esterase-positive cells in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. *J Clin Pathol* 1983; 36(3): 303-6.
- ⁷⁰ Murata SI, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, Yamashita H, Urata Y, Ashihara T, Katoh R. Morphological abstraction of thyroid tumor cell nuclei using morphometry with factor analysis. *Microsc Res Tech* 2003; 61:457-462.
- ⁷¹ Namyslowski G, Scierski W, Nozyński JK, Zembala-Nozyńska E. Morphometric characteristics of cell nuclei of the precancerous lesions and laryngeal cancer. *Med Sci Monit* 2004;10:241-245.
- ⁷² Aziz DC, Peter JB. DNA ploidy and cell-cycle analysis: tools for assessment of cancer prognosis. *J Clin Lab Anal* 1991;5:422-38.
- ⁷³ Borgman V, al-Abadi H, Nagel R. Prognostic relevance of DNA ploidy and proliferative activity in urothelial carcinoma of the renal pelvis and ureter: a study on a follow-up period of 6 years. *Urol Int* 1991;47:7-11.

-
- ⁷⁴ Russack V. Image Cytometry: Current Applications and Future Trends. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1994;31:1-34.
- ⁷⁵ Berchuck A, Boente MP, Kerns BJ, et al. Ploidy analysis of epithelial ovarian cancers using image cytometry. *Gynecol Oncol* 1992;44:61-5.
- ⁷⁶ Haroske G, Giroud F, Reith A, Bocking A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol* 1998;17(4):189-200.
- ⁷⁷ Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Boecking A. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 2001;23:89-95.
- ⁷⁸ Kardum Skelin I. Morfometrijski i kinetički parametri kao dijagnostički i prognostički čimbenici leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti. Doktorska disertacija, 2008.
- ⁷⁹ Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1995; 8: 67-74.
- ⁸⁰ Bibbo M, Bartels PH, Dytch HE, Wied GL. Cell Image Analysis. In: Bibbo M. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia:W.B. Saunders Company; 1991.p. 965-983.
- ⁸¹ Auer GU, Askensten U, Erhardt K, Fallenius A, Zetterberg A. Comparison between slide and flow cytophotometric DNA measurements in breast tumors. *Analyt Quant Cytol Histol* 1987; 9(2): 138-46.
- ⁸² Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Analyt Quant Cytol Histol* 1980;2(3):161-5.
- ⁸³ Smets LA, Slater R, van Wering ER, van der Does- van den Berg A, Hart AA, Veerman AJ, Kamps WA. DNA index and %S-phase cells determined in acute lymphoblastic leukemia of children: a report from studies ALL V, ALL VI, and ALL VII (1979-1991) of the Dutch childhood leukemia study group and the Netherlands workgroup on cancer genetics and cytogenetics. *Med Pediatr Oncol* 1995; 25(6): 437-44.
- ⁸⁴ VanVelthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ, Zandona C, Zlotta A, Van der Meijden APM, et al. Image cytometry determination of ploidy level, proliferative activity and nuclear size in a series of 314 transitional bladder cell carcinomas. *Hum Pathol* 1995; 26(1): 3-11.

-
- ⁸⁵ Fausel RE, Burleigh W, Kaminsky DB. DNA quantification in colorectal carcinoma using flow and image analysis cytometry. *Analyt Quant Cytol Histol* 1990; 12(1): 21-27.
- ⁸⁶ Forsslund G, Zetterberg A. A quantitative evaluation of cytophotometric DNA analysis in retrospective studies using archival tumor specimens. *Analyt Quant Cytol Histol* 1990; 12(4): 259-66.
- ⁸⁷ Gardikas C, Israels M. The Feulgen reaction applied to clinical haematology. *J Clin Pathol* 1948; 1: 226.
- ⁸⁸ Chieco P, Derenzini M. The Feugen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol* 1999; 111: 345-358.
- ⁸⁹ Bőcking A, Striepecke E, Auer H, Fuzesi L. Static DNA cytometry: biological background, technique and diagnostic interpretation. U: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenck U, ur. *Compendium on the computerized cytology and histology laboratory*. Chicago: Tutorial of Cytology; 1994:107-28.
- ⁹⁰ Kisner HJ. Principles and clinical application of image analysis. *Clin Lab Med* 1988;8:723-36.
- ⁹¹ Štemberger-Papić S, Stanković T, Vrdoljak-Mozetič D, Verša-Ostojić D, Krašević M, Štifter S, Audy-Jurković S. Morphometry and digital AgNOR analysis in cytological imprints of benign, boderline and malignant serous ovarian tumours. *Cytopathology* 2006;17:382-289.
- ⁹² Rajesh L, Saha M. Radhika S, Das Radotra B, Rajwanshi A. Morphometric image analysis of follicular lesions of the thyroid. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:117-20.
- ⁹³ Brahmi U, Rajwanski A, Joshi K, Dey P, Vohra H, Granguly NK, Gupta SK. Automated nuclear image morphometry of fine needle aspiration smears of malignant round cell tumours. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:287-290.
- ⁹⁴ Rajesh L, Pattari SK; Garewal G, Dey P, Srinivasan R. Image morphometry of acute leukemias. Comparison between lymphoid and myeloid subtypes. *Anal Quant Cytol Histol* 2004;26:57-60.
- ⁹⁵ Rajesh L, Dey P, Joshi K. Automated image morphometry of lobular breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2002;24:81-84.
- ⁹⁶ Dey P, Ghoshal S, Pattari SK. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2000;22:483-485.
- ⁹⁷ Pektas ZÖ, Keskin A, Gilnhan Ö, Karslioglu T. Evaluation of Nuclear Morphometry and DNA Ploidy Status for Detection of Malignant and Premalignant Oral Lesions: Quantitative Cytologic Assessment and Review of

Methods for Cytomorphometric Measurements. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:628-635.

⁹⁸ Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-7.

⁹⁹ Enchev V. DNA Ploidy and Morphometric Features of Normal, Hyperplastic, Premalignant and Malignant Specimens: An Evaluation. *Analyt Quant Cytol Histol* 1998;20:288-296.

¹⁰⁰ Gockel I, Kämmerer P, J Brieger J, Heinrich UR, Mann WJ, Bittinger F, Eckardt VF, Junginger T. Image cytometric DNA analysis of mucosal biopsies in patients with primary achalasia. *World J Gastroenterol* 2006; 12:3020-3025.

¹⁰¹ Tosi P, Miracco C, Luzi P, Cintonino M, Kraft R, Cottier H. Morphometric distinction of granulomas in tuberculosis and sarcoidosis. Difference in nuclear profiles. *Analyt Quant Cytol Histol* 1986; 8(3): 233-240.

¹⁰² Okabe T, Suzuki A, Ishikawa H, Watanabe I, Takaku F. Chromosomal aneuploidy in sarcoid granuloma cells. *Am Rev Respir Dis* 1986.;134:300-4.

¹⁰³ Okabe T. Origin and cytogenetic abnormalities of sarcoid epithelioid cells. *Nippon Rinsho* 1994;6:1449-55.

¹⁰⁴ Ornvold K, Carstensten H, Christensen I, Karsen JK, Christensen U. DNA aneuploidy in sarcoid granuloma (Letters to the editor). *J Clin Pathol* 1989;42:1225-6.

¹⁰⁵ Klech H, Hutter C. (ed.) Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1990;3:937-974.

¹⁰⁶ Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G, McSharry C, Baldwin CI, Calvert JE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J* 2001;18(Suppl):81s-92s.

¹⁰⁷ Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Müller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y. Clinical Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:952-958.

¹⁰⁸ Jyonouchi H. Airway epithelium and apoptosis. *Apoptosis* 1999; 4:407-417.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 29.09.1961. u Požegi, gdje sam završila osnovno i srednje obrazovanje.

Diplomirala sam 1986. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pripravnički staž i poslijediplomski studij iz medicinske citologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila sam 1987. godine. Od 1987 do 1991. godine radila sam kao liječnik opće prakse u Domu zdravlja „Maksimir“.

Specijalizaciju iz medicinske citologije za Kliniku za plućne bolesti „Jordanovac“ započela sam 1992. godine, a specijalistički ispit položila sam 1995. godine, od kada radim u Citološkom laboratoriju Klinike za plućne bolesti „Jordanovac“. Magistarski rad: „Korelacija ekspresija produkta gena nm23 s TNM stadijem i preživljenjem u bolesnika s adenokarcinomima pluća“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, mentor Prof.dr.sc. Šimun Križanac, obranila sam 1999. godine.

Sudjelujem u nastavi iz pulmološke citologije na organiziranim tečajevima izobrazbe citoskrienera od 1993. godine. Od 1995. sudjelujem u nastavi na znanstvenom, kasnije stručnom poslijediplomskom studiju iz medicinske/kliničke citologije, predmet pulmološka citologija, te u edukaciji liječnika na specijalizaciji iz kliničke citologije. Sudjelujem na poslijediplomskim tečajevima trajne edukacije Medicinskog fakulteta I. kategorije.

Autor sam 58 radova, od toga 7 radova i 9 kongresnih sažetaka u časopisima koje citira Current Contents, 12 radova u časopisima koje citiraju Index Medicus i Embase, poglavlja u knjigama i nastavnih tekstova, te 24 kongresna priopćenja. Tajnica Hrvatskog društva za kliničku citologiju HLZ-a bila sam od 1993-1997. godine, od 1992-1995. član QUATE (Komisija za kontrolu kvalitete i edukaciju) pri EFCS (Europska federacija citoloških društava), a od 1997. godine do sada član sam Upravnog odbora Hrvatskog društva za kliničku citologiju HLZ-a, te član povjerenstava pri Ministarstvu zdravstva RH (izobrazba citotehničara, izrada programa specijalizacije).

Voditelj sam Citološkog laboratorija Klinike za plućne bolesti „Jordanovac“ od 2004. godine. Zvanje primarijus stekla sam u svibnju 2008. godine odlukom Povjerenstva Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske.