

# MikroRNA kao potencijalne terapijske mete i biomarkeri u kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti

---

**Pulić, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:059960>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Marija Pulić**

**MikroRNA kao potencijalne terapijske mete i biomarkeri u kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura, na prenesenom znanju tijekom akademskog obrazovanja te na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju i pomoći prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala mojim prijateljima koji su bili uz mene i pomogli mi da prijedem sve prepreke. Hvala što ste se radovali sa mnom, ali i što ste bili oslonac kad je bilo najteže. Učinili ste posebnim ovaj period života.*

*Posebnu zahvalu želim uputiti svojim roditeljima i bratu koji su vjerovali u mene od malih nogu. Hvala što ste mi pružili ljubav, potporu i omogućili da ostvarim svoje snove.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	4
3. MATERIJALI I METODE .....	5
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	6
4.1. Kronična opstruktivna plućna bolest.....	6
4.1.1. Etiologija i patofiziologija KOPB-a.....	6
4.1.2. Dijagnoza KOPB-a i trenutni terapijski pristup.....	8
4.2. MikroRNA.....	9
4.2.1. Biogeneza miRNA molekula .....	9
4.2.2. Mehanizam djelovanja miRNA molekula.....	12
4.3. MiRNA kao potencijalni terapeutici u KOPB-u.....	14
4.3.1. Terapeutici sintetizirani na temelju miRNA .....	14
4.3.2. MiRNA molekule uključene u patogenezu KOPB-a .....	15
4.4. MiRNA kao potencijalni biomarkeri u KOPB-u .....	20
4.5. Izvanstanične vezikule i miRNA u KOPB-u.....	22
4.5.1. Otkriće, biogeneza i funkcija izvanstaničnih vezikula.....	22
4.5.2. Uloga izvanstaničnih vezikula u KOPB-u .....	24
4.5.3. Uloga egzosomalnih miRNA u razvoju KOPB-a .....	25
4.5.4. Izvanstanične vezikule kao potencijalni biomarkeri u KOPB-u.....	27
4.5.5. Izvanstanične vezikule kao potencijalni terapeutici u KOPB-u.....	27
4.5.6. Izvanstanične vezikule kao nosači lijekova .....	28
5. ZAKLJUČCI.....	30
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	32
7. LITERATURA .....	36
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	48
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

# 1. UVOD

Kronična opstruktivska plućna bolest (engl. chronic obstructive pulmonary disease, KOPB) heterogena je bolest karakterizirana ireverzibilnim i progresivnim oštećenjem dišnih putova praćena razdobljima akutnog pogoršanja što za posljedicu ima smanjenje plućne funkcije (Vogelmeier i sur., 2020). KOPB je treći vodeći uzrok smrtnosti u svijetu i kao takav predstavlja rastući globalni zdravstveni problem (Osei i sur., 2015). Prevalencija ove bolesti među zemljama varira ovisno o stupnju njihova razvoja, stoga je, zbog povećane izloženosti produktima izgaranja biomase, porast slučajeva veći u zemljama niskog ekonomskog statusa. Prema podacima iz 2020. godine, od KOPB-a boluje oko 10 % svjetske populacije starije od 45 godina, povećano na 50 % kod pušača (Barnes, 2020). Prema podacima iz 2018. godine, učestalost u Republici Hrvatskoj je od 10 do 15 % (Vrbica i sur., 2018).

Starosna dob jedan je od rizičnih čimbenika za razvoj KOPB-a, stoga se bolest češće javlja u osoba starije životne dobi, no može zahvatiti i mlađe pojedince. Simptomi su individualni, podložni varijacijama tijekom dana i najizraženiji tijekom jutra i noći. Najčešće prijavljeni su dispneja, kronični kašalj i produkcija sluzi. Simptomi imaju ograničavajući utjecaj na pacijente u smislu obavljanja svakodnevnih aktivnosti, posebice onih izrazito fizički zahtjevnih (Duffy i Criner, 2019; Miravittles i Ribera, 2017).

Veliki problem oboljelima predstavljaju egzacerbacije definirane uzastopnim epizodama pogoršanja bolesti (Pavord i sur., 2016). Riječ je o često neprepoznatom, time i neliječenom stanju što za posljedicu ima progresivnu opstrukciju plućne funkcije i negativan utjecaj na kvalitetu života, broj hospitalizacija i mortalitet (Segal i Martinez, 2018). Najčešći induktori egzacerbacija su virusi (rinovirusi) i bakterije (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*) koji uzrokuju infekcije respiratornog sustava te okolišni polutanti (Mackay i Hurst, 2012). Simptomi akutnog pogoršanja su bronhospazam i povećana produkcija sputuma, slabiji protok zraka i dispneja. Prevencija egzacerbacija uključuje izbjegavanje čimbenika rizika, cijepljenje i adekvatno liječenje komorbiditeta (Pavord i sur., 2016).

Razvoj KOPB-a rezultat je komplicirane interakcije genetičkih i okolišnih etioloških čimbenika (Vogelmeier i sur., 2020). Pojavi bolesti najviše doprinosi dugotrajna izloženost toksičnim česticama i plinovima, primjerice dimu cigarete i zagađivačima iz okoliša. Ekspozicija plućnog epitela ovim čimbenicima uzrokuje otpuštanje proupalnih medijatora i infiltraciju upalnih stanica što doprinosi amplifikaciji upale, oslobađanju proteaza i reaktivnih kisikovih spojeva

koji oštećuju parenhim plućnog tkiva rezultirajući nastankom emfizema. Ponavljanje ozljeda tkiva doprinosi aktivaciji fibroblasta, odnosno povećanom odlaganju izvanstaničnog matriksa i remodeliranju malih dišnih puteva (Osei i sur., 2015).

Dijagnostika bolesti temelji se na spirometriji, a u prevenciji i liječenju preporuča se primjena nefarmakoloških mjera, primjerice prestanak pušenja, cijepljenje, plućna rehabilitacija i tjelesna aktivnost. Jednom kad je dijagnosticiran, stabilni KOPB liječi se farmakoterapijski ovisno o stupnju težine bolesti. Farmakološka terapija usmjerena je na ublažavanje simptoma, smanjenje učestalosti i težine egzacerbacija te poboljšanje općeg zdravstvenog statusa pacijenta uz unaprjeđenje kvalitete života (Vogelmeier i sur., 2020).

S obzirom na rastući broj oboljelih, visoku stopu hospitalizacije i značajan negativan utjecaj na svakodnevni život pacijenata, KOPB predstavlja svjetski zdravstveni problem koji zahtijeva povećane napore za pronalaskom novih terapijskih i dijagnostičkih metoda (Vogelmeier i sur., 2020). U posljednje vrijeme, veliki interes istraživača privukle su mikroRNA molekule, inače uključene u patogenezu raznih bolesti (Rupaimoole i Slack, 2017).

MikroRNA (miRNA, miR) su 19-22 nukleotida duge, evolucijski konzervirane, nekodirajuće, regulatorne RNA molekule (Gon i sur., 2020). Prvu miRNA molekulu, naziva *lin-4*, otkrio je 1993. godine Lee, zajedno sa svojim suradnicima, tijekom proučavanja razvojnog ciklusa oblića vrste *Caenorhabditis elegans*. Uočeno je kako otkrivena molekula negativno utječe na ekspresiju nuklearnog proteina LIN-14 odgovornog za razvoj ličinki iz prvog larvalnog stadija (L1) u drugi (L2) (Lee i sur., 1993). Mehanizam regulacije ekspresije navedenog proteina temelji se na posttranskripcijskom vezanju *lin-4* miRNA na komplementarnu 3' netranslatiranu regiju (engl. 3' untranslated region, 3' UTR) *lin-14* mRNA što za posljedicu ima smanjenu translaciju *lin-14* mRNA (Wightman i sur., 1993). Rezultati ovih dviju studija smatrani su fenomenom sve dok nije 2000. godine otkrivena druga miRNA molekula, naziva *let-7*, koja pripada obitelji visokokonzerviranih miRNA, kasnije detektiranih u širokom spektru vrsta (Bhaskaran i Mohan, 2014; Roush i Slack, 2008).

MiRNA molekule post-transkripcijski moduliraju gensku ekspresiju na temelju komplementarnog sparivanja s ciljnom mRNA molekulom, inhibicijom translacije, odnosno njenom degradacijom. Štoviše, na ovaj način miRNA molekule sudjeluju u raznim biološkim procesima kao što su stanična proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Poremećena regulacija njihove funkcije može doprinijeti razvoju patoloških stanja poput različitih tipova karcinoma (dojke, pluća, jajnika, kolona), neuroloških poremećaja (Alzheimerova bolest, shizofrenija,

multipla skleroza), ali i metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti (Correia de Sousa i sur., 2019; Liu i sur., 2014).

Broj dokaza koji ukazuju na važnost uloge koju ove molekule imaju u razvoju i patogenezi respiratornih bolesti u stalnom je porastu. Također, ističe se potencijal miRNA molekula kao novih terapijskih meta u liječenju KOPB-a, karcinoma pluća, astme i plućne fibroze. Modifikacija ekspresije miRNA u stanicama od interesa predstavlja mogući put za razvoj terapeutika, a obzirom na njihovu stabilnost u tjelesnim tekućinama, miRNA bi mogle postati novi biomarkeri (Zhu i sur., 2020).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična opstruktivska plućna bolest upalna je bolest dišnih putova koja zahvaća veliki udio populacije te ima tendenciju širenja čime postaje sve veći problem globalnog javnog zdravstva. Razvoju bolesti doprinosi ekspozicija štetnim čimbenicima iz okoliša, među kojima su vodeći rizični čimbenici pušenje i polutanti iz zraka. S obzirom da je bolest praćena akutnim egzacerbacijama i brojnim komorbiditetima, značajno utječe na smanjenje kvalitete života pacijenata, stoga su rana dijagnoza i početak liječenja imperativ.

KOPB je obilježena kroničnom upalom koja doprinosi opstrukciji protoka zraka i propadanju plućne funkcije otežavajući disanje. U liječenju se primjenjuju dugodjelujući agonisti  $\beta_2$  receptora, dugodjelujući muskarinski antagonisti i inhalacijski kortikosteroidi. Nedostatak trenutne terapije je njena usmjerenost na ublažavanje simptoma i smanjenje učestalosti i težine egzacerbacija, stoga je neophodno razvijati nove lijekove koji djeluju na mehanizam nastanka bolesti.

U tom svjetlu, u posljednjih desetak godina zabilježen je značajan porast broja istraživačkih radova koji se bave ulogom miRNA molekula u patogenezi KOPB-a. Ove male, nekodirajuće molekule komplementarnim vezanjem za odgovarajuću mRNA molekulu kontroliraju njenu ekspresiju i sintezu pripadajućeg proteina. Modulacijom razine regulacije miRNA moguće je utjecati na razvoj i progresiju KOPB-a što ostavlja širok prostor za buduća ispitivanja novih terapijskih molekula i biomarkera.

Cilj ovog diplomskog rada je pružiti pregled uloge određenih miRNA molekula u uključenih u patogenezu KOPB-a te istaknuti njihov potencijal kao mogućih terapeutika i biomarkera. Poglavlja koja slijede obuhvaćaju do sada najbolje istražene i opisane miRNA molekule u kontekstu njihove uloge u nastanku i progresiji KOPB-a.



### 3. MATERIJALI I METODE

U svrhu izrade ovog preglednog diplomskog rada, pretraživane su baze podataka PubMed i ScienceDirect, a najčešće korištene ključne riječi u pretraživanjima su: „miRNA“, „miRNA and biogenesis“, „miRNA mechanism“, „miRNA and COPD“, „COPD“, „COPD and etiology“, „COPD and pathophysiology“, „COPD and pathology“, „miRNA therapeutics and COPD“, „miRNA biomarkers and COPD“, „extracellular vesicles“, „extracellular vesicles and biogenesis“, „extracellular vesicles and COPD“. Osim navedenih baza podataka, za potrebe pisanja ovog rada korišten je hrvatski prijevod knjige The Cell: A molecular approach, autora G. Coopera i R. Hausman.

Kao izvor informacija korištena je i mrežna stranica <https://goldcopd.org/>.

S ciljem osiguranja što novijih i pouzdanijih informacija, u pretraživanje su većinom bili uključeni radovi objavljeni unutar zadnjih 10 godina.

U ovaj pregledni diplomski rad uključeno je 109 literaturnih navoda.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Kronična opstruktivna plućna bolest

#### 4.1.1. Etiologija i patofiziologija KOPB-a

Nastanku KOPB-a pridonose različiti etiološki čimbenici u koje ubrajamo duhanski dim, profesionalnu izloženost prašini, kemikalijama i parama, udisanje zagađenog zraka, starenje, infekcije, astmu, socioekonomski status, spol i genetiku (Mannino i Buist, 2007). Konzumacija cigareta predstavlja vodeći rizični čimbenik za razvoj KOPB-a kod aktivnih pušača, ali i kod pasivnih pušača. Naime, pasivna izloženost dimu cigareta u kućanstvu ili na radnom mjestu, povezana je s oslabljenom plućnom funkcijom u usporedbi s osobama koje istom nisu bile izložene (Hagstad i sur., 2014).

Iako je KOPB snažno povezana s pušenjem i utjecajem ostalih okolišnih čimbenika, neće svi pušači razviti bolest što ukazuje na genetičku podlogu koja može povećati osjetljivost pojedinaca na duhanski dim (Regan i sur., 2010). Genetski čimbenik rizika je deficijencija  $\alpha$ 1-antitripsina (engl.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency, AATD), vrlo rijedak autosomno-recesivni poremećaj prisutan u 1-3 % osoba koje boluju od KOPB-a (Mammen i Lee, 2021).  $\alpha$ 1-antitripsin inhibitor je neutrofilne elastaze i kodiran je genom SERPINA 1 na kromosomu 14. Točkasta mutacija uzrokuje supstituciju glutaminske kiseline za lizin na položaju 342 i odgovorna je za smanjenu sekreciju  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT) iz hepatocita (Berndt i sur., 2012; Wan i Silverman, 2009). Nastala neravnoteža između AAT i neutrofilne elastaze povećava rizik od nastanka emfizema (Silverman i Sandhaus, 2009).

Osim za AATD, niti za jedan drugi gen nije u potpunosti dokazana uzročno-posljedična veza s razvojem KOPB-a, već je riječ o kompleksnoj interakciji genetičkih, epigenetičkih i okolišnih čimbenika koji čine osnovu za razvoj kroničnog upalnog odgovora, ubrzano stanično starenje, staničnu smrt i fibrozu što se manifestira kliničkim simptomima bolesti, odnosno različitim fenotipskim obilježjima (Mammen i Lee, 2021).

Remodeliranje i suženje malih dišnih puteva te opstrukcija plućnog parenhima praćena destrukcijom alveolarnog zida, glavni su patološki procesi karakteristični za KOPB, a posljedica su abnormalnog odgovora imunskog sustava u plućima na udahnute štetne čestice i plinove iz okoliša (Caramori i sur., 2016).

U upalni odgovor uključene su stanice urođene imunosti (neutrofili, makrofagi, stanice prirodne ubojice (engl. natural killer cells, NK),  $\gamma\delta$  T stanice, urođene limfoidne stanice, dendritičke stanice) te stečene imunosti (T i B limfociti), kao i strukturne stanice respiratornog sustava (epitelne stanice, endotelne stanice, fibroblasti) (Barnes, 2004).

Iritansi, kao što su duhanski dim i polutanti, aktiviraju plućne epitelne stanice i makrofage rezultirajući otpuštanjem različitih kemotaktičnih čimbenika koji privlače stanice imunskog sustava na mjesto upale. Među kemoatraktantima izdvajaju se CCL2 koji privlači monocite putem receptora CCR2 na njihovoj površini, CXCL1 i CXCL8 koji preko CXCR2 privlače neutrofile i monocite te CXCL9, CXCL10 i CXCL11 koji putem CXCR3 privlače CD8+ citotoksične T stanice i CD4+ T pomagačke stanice. Makrofagi otpuštaju IL-23, snažan kemoatraktant za Th17 stanice koje produciraju IL-17 odgovoran za promociju neutrofilne upale. Epitelne stanice i makrofagi otpuštaju transformirajući čimbenik rasta beta (engl. transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ), endotelin i čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. connective tissue growth factor, CTGF), koji stimuliraju aktivaciju fibroblasta i posreduju nastanak fibroze oko malih dišnih puteva što prethodi razvoju emfizema. Osim navedenih fibrogenih medijatora, makrofagi i epitelne stanice uz neutrofile izlučuju metaloproteinaze matriksa (engl. matrix metalloproteinases, MMP), enzime koji razgrađuju vlakna elastina i time pridonose razvoju emfizema. Dodatno, neutrofili otpuštaju neutrofilnu elastazu, katepsin G i proteinazu-3 koje djeluju kao potentni stimulatori mukozne sekrecije čemu pridonosi hiperplazija submukoznih žlijezda, što se manifestira pojavom kroničnog produktivnog kašlja (Barnes, 2017).

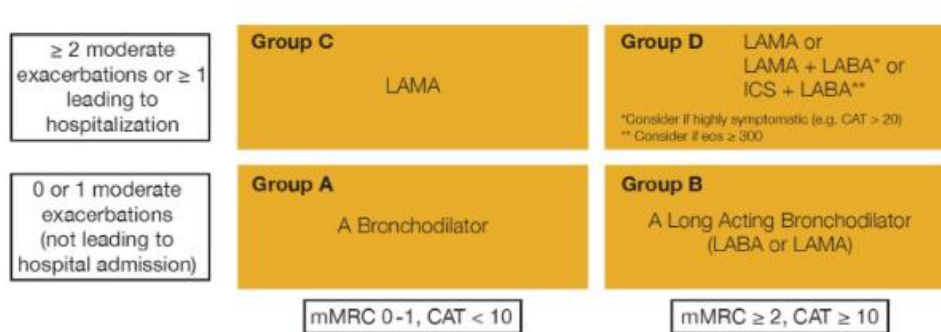
Oksidacijski stres, izražen u plućima pacijenata s KOPB-om, posljedica je narušene ravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. reactive oxygen species, ROS) i njihove neutralizacije antioksidacijskim mehanizmima organizma. Razlog tomu je povećana izloženost organizma egzogenim izvorima oksidansa kao što su cigaretni dim i polutanti iz okoliša. Alveolarni makrofagi i neutrofili, aktivirani u upalnom odgovoru, endogeni su izvor reaktivnih kisikovih spojeva, uz mitohondrijski respiracijski lanac plućnih epitelnih stanica. Smanjena aktivnost antioksidacijskog obrambenog sustava, posljedica je inaktivacije Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) i FoxO3a (Forkhead box O3a), čimbenika uključenih u transkripcijsku regulaciju gena za antioksidanse (Barnes, 2020). Povišene razine biljega oksidacijskog stresa (npr. vodikov peroksid, 8-izoprostan) određene su u kondenzatu izdahnutog zraka, dok je snižena razina endogenog antioksidansa glutaciona detektirana u bronhoalveolarnom ispirku (engl. bronchoalveolar lavage, BAL) pacijenata s KOPB-om, a

navedena odstupanja posebice su izražena tijekom akutnih egzacerbacija (Kirkham i Barnes, 2013).

#### **4.1.2. Dijagnoza KOPB-a i trenutni terapijski pristup**

Zlatni standard u dijagnostici i praćenju progresije KOPB-a je spirometrija, neinvazivna metoda temeljena na mjerenju dvaju parametara, forsiranog ekspiratornog volumena u jednoj sekundi (engl. forced expiratory volume in one second, FEV<sub>1</sub>), nakon primjene bronhodilatatora kratkog djelovanja, i forsiranog vitalnog kapaciteta (engl. forced vital capacity, FVC) (Hoesterey i sur., 2019). Prema trenutno važećim smjernicama Globalne inicijative za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD), omjer izmjerenih parametara (FEV<sub>1</sub>/FVC) te FEV<sub>1</sub> koriste se za klasifikaciju težine bronhoopstrukcije (<https://goldcopd.org>). Osim spirometrije, u klasifikaciji težine bolesti važnu ulogu ima procjena simptoma. U tu svrhu koriste se validirane ljestvice, među kojima se ističe mMRC upitnik (engl. modified British Medical Research Council questionnaire) za procjenu stupnja dispneje te CAT upitnik (engl. COPD Assessment Test) koji uključuje procjenu više simptoma (kašalj, stezanje u prsima, produkcija sluzi, kvaliteta sna, umor) (Duffy i Criner, 2019).

U prevenciji i liječenju KOPB-a, preporuča se implementacija nefarmakoloških mjera kao što su prestanak pušenja, cijepljenje (influenca, pneumokok), plućna rehabilitacija i tjelesna aktivnost. Jednom kad je dijagnosticirana, stabilna KOPB liječi se farmakoterapijski ovisno o stupnju težine bolesti. Trenutna farmakološka terapija KOPB-a može reducirati simptome, učestalost i težinu egzacerbacija. Po uspostavi kliničke i spirometrijske dijagnoze KOPB-a, za optimalan izbor početnog liječenja primjenjuju se kliničke GOLD smjernice, odnosno ABCD model (Slika 1) koji uključuje individualiziranu procjenu simptoma i rizika od egzacerbacija te pruža mogućnost odabira terapije na temelju najboljih dostupnih kliničkih dokaza (Vogelmeier i sur., 2020).



Slika 1. Shematski prikaz početnog liječenja KOPB-a (preuzeto iz <https://goldcopd.org> uz dopuštenje izdavača).

CAT: upitnik koji uključuje procjenu simptoma, ICS: inhalacijski kortikosteroidi, LABA: dugodjelujući agonisti  $\beta 2$  receptora, LAMA: dugodjelujući muskarinski antagonisti, mMRC: upitnik za procjenu stupnja dispneje

Izbor terapije personaliziran je te ovisi o njenoj dostupnosti i karakteristikama pacijenta, a uglavnom se primjenjuju dugodjelujući agonisti  $\beta 2$  receptora (engl. long-acting  $\beta 2$ -agonists, LABA), dugodjelujući muskarinski antagonisti (engl. long-acting muscarinic antagonists, LAMA) i inhalacijski kortikosteroidi (ICS) (Vogelmeier i sur., 2020).

Početak liječenja moguć je primjenom jednog dugodjelujućeg bronhodilatatora, dok se kombinirani pristup upotrebom LAMA/LABA primjenjuje primjerice kod pacijenata s teškom dispnejom, a LABA/ICS u pacijenata s visokim rizikom od egzacerbacija i eozinofilijom. Inhalacijski bronhodilatatori preferirani su u odnosu na oralne, pri čemu je ključna ispravna inhalacijska tehnika. Dugoročna monoterapija inhalacijskim kortikosteroidima nije preporučljiva, no trajna ICS terapija može biti primijenjena u kombinaciji s LABA u pacijenata s poviješću egzacerbacija. Nakon uspostave režima početne terapije, pacijente je nužno pomno pratiti i procjenjivati njihov napredak te, ukoliko je potrebno, modificirati terapiju (<https://goldcopd.org/>).

## 4.2. MikroRNA

### 4.2.1. Biogeneza miRNA molekula

Geni koji kodiraju za miRNA nalaze se na različitim mjestima u ljudskom genomu, a dijele se na intragenske i intergenske. Većina miRNA gena smještena je u intragenim regijama ugrađenim unutar introna i eksona drugih protein-kodirajućih / nekodirajućih gena, odnosno unutar UTR regija i ponavljajućih regija u genomu. Najčešće se organiziraju u skupine, tzv.

klustere, koji se prepisuju kao policistronski transkripti s jednim promotorom, iako neke miRNA mogu biti i monocistronske te imaju vlastiti promotor (Khan i sur., 2019).

Transkripcija gena za miRNA odvija se u jezgri pomoću RNA polimeraze II (RNA pol II), a njen produkt je dugačak transkript koji se naziva primarna miRNA (pri-miRNA) (Slika 2) (Vishnoi i Rani, 2017). Nastali transkript sadrži strukturu matične petlje, terminalnu petlju i jednolančane RNA segmente na krajevima, dok na 5' kraju ima 7-metilgvanozin (m<sup>7</sup>G), a 3' kraj modificiran je poliadenilacijom (poli-A rep) (Khan i sur., 2019).

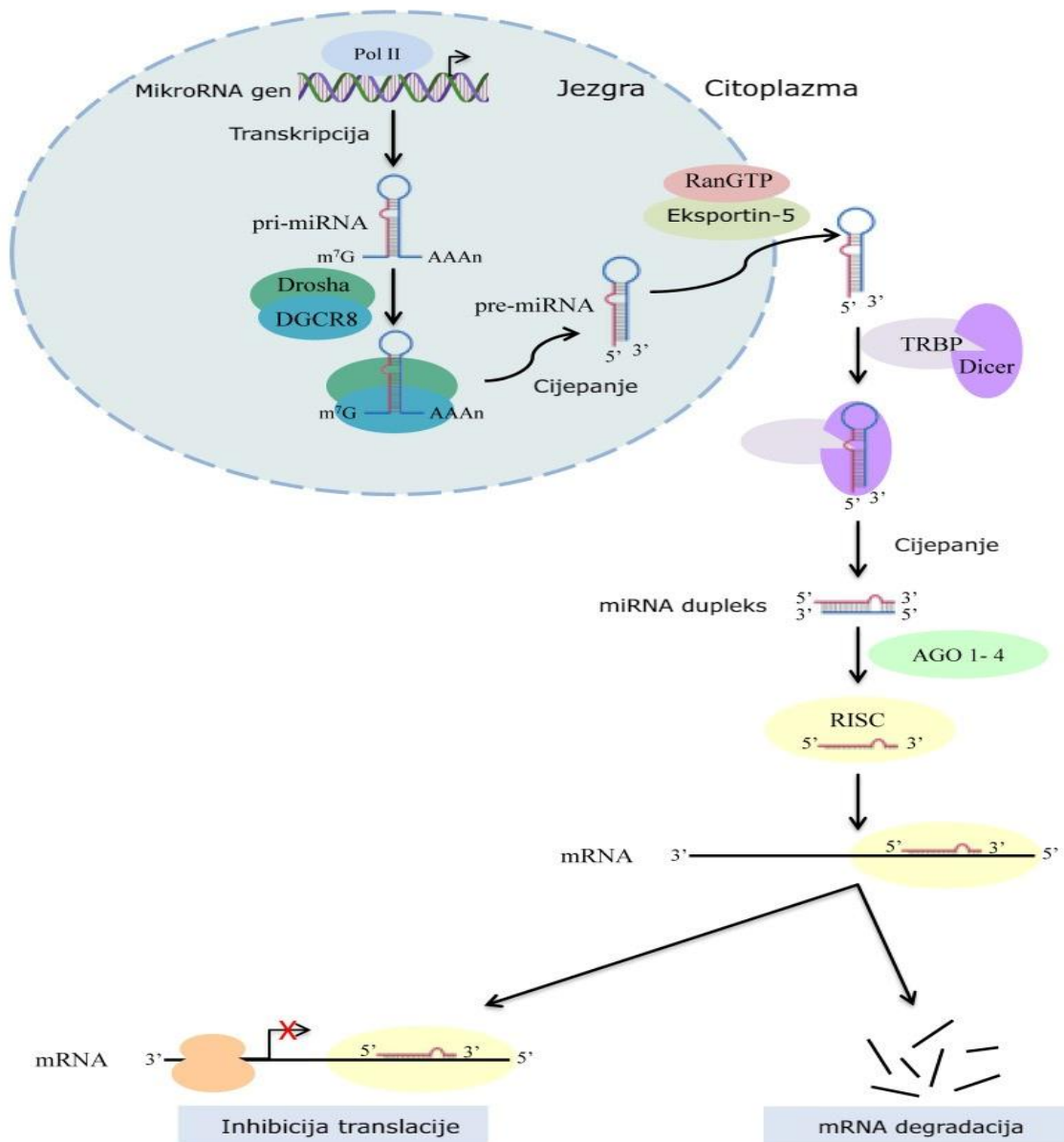
U jezgri djelovanjem mikroprocesornog kompleksa sastavljenog od RNaze endonukleaze III Drosha i njezinog kofaktora DGCR8/Pasha (engl. DiGeorge Syndrome Critical Region 8) od pri-miRNA nastaje prekursorska miRNA (pre-miRNA) (O'Brien i sur., 2018). Drosha ima dvije RNaza III domene, koje čine dimer, i jednu domenu koja veže dvolančanu RNA (engl. double-stranded RNA binding domain, dsRBD). DsRBD u sklopu Drosha-e nije dovoljna za vezanje na pri-miRNA, stoga joj pomaže partnerski protein DGCR8 koji ima dvije dsRBD pomoću kojih prepoznaje spoj jednolančana RNA (ssRNA) - dvolančana RNA (dsRNA), karakterističan za pri-miRNA. Zatim se DGCR8 usidri na mjesto spoja i usmjerava Drosha-u na daljnju obradu pri-miRNA. Dvije RNaza III domene Drosha-e cijepaju pri-miRNA na 3' i 5' krajevima jednolančanog segmenta pri-miRNA, približno 11 nukleotida dalje od mjesta spoja ssRNA-dsRNA, čime nastaje pre-miRNA (Han i sur., 2009). Nastala molekula duga je 70-100 nukleotida, ima sekundarnu strukturu ukosnice i privjesak duljine 2 nukleotida na 3' kraju (Han i sur., 2004).

Privjesak na 3' kraju pre-miRNA prepoznaje transportni protein eksportin-5 (engl. exportin-5, Exp-5) koji usmjerava translokaciju pre-miRNA kroz jezgrine pore u citoplazmu. Osim Exp-5, za prijenos pre-miRNA u citoplazmu nužan je protein Ran. Unutar jezgre, Ran veže GTP (Ran-GTP) i formira se kompleks kojeg čine Ran-GTP, Exp-5 i pre-miRNA. U citoplazmi se nalazi Ran GTPazni aktivirajući protein (engl. Ran GTPase activating protein, Ran-GAP) koji hidrolizira Ran-GTP u Ran-GDP otpuštajući tako Exp-5 i pre-miRNA u citoplazmu (Khan i sur., 2019). Osim transporta, Exp-5 sudjeluje u stabilizaciji pre-miRNA u jezgri sprječavajući njenu degradaciju (Liu i sur., 2008).

U citoplazmi, RNaza endonukleaza III Dicer kida pre-miRNA na dvolančanu miRNA molekulu. Riječ je o visoko konzerviranom enzimu koji sadrži više domena, uključujući helikazne domene, PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) domenu, dvije RNaza III domene (RNazaIIIa/b) te dsRBD (Theotoki i sur., 2020). PAZ domena prepoznaje privjesak duljine 2

nukleotida na 3' kraju pre-miRNA, dok regija između domene PAZ i RNaza III domena određuje veličinu nastale miRNA (Fareh i sur., 2016). RNazaIII domene cijepaju strukturu ukosnice pri čemu nastaje dupleks miRNA duljine približno 22 nukleotida s karakterističnim ostatkom od 2 nukleotida na 3' kraju (Khan i sur., 2019). Stabilnost endonukleaze Dicer i uspješno cijepanje pre-miRNA pomažu TAR RNA vezujući protein (engl. transactivation response RNA binding protein, TRBP) i aktivator proteinske kinaze R (engl. protein kinase R-activating protein, PACT) koji, zajedno s Dicerom, uz visokokonzervirane Argonaute proteine (engl. Argonaute proteins, Ago), formiraju RNA-inducirani utišavački kompleks (engl. RNA-induced silencing complex, RISC) (Khan i sur., 2019; Wu i sur., 2020).

Zrela dvolančana miRNA nanosi se na Ago proteine, a potom je Dicer svojom helikaznom aktivnošću razmata na dva lanca. Lanac čija je termodinamička stabilnost 5' kraja manja naziva se lanac vodič (engl. guide strand), dok se lanac veće termodinamičke aktivnosti na istom kraju naziva lanac putnik (engl. passenger strand). U RISC kompleks ugrađuje se samo lanac vodič, dok Ago2 protein razgrađuje putnički lanac čime nastaje miRNA-inducirani utišavački kompleks (engl. miRNA-induced silencing complex, miRISC) (Olejniczak i sur., 2018).



Slika 2. Prikaz biogeneze i mehanizma djelovanja miRNA molekula (preuzeto i prilagođeno prema Theotoki i sur. (2020) uz dopuštenje izdavača).

AGO 1-4: Argonaute proteini 1-4, DGCR8: kofaktor enzima Drosha, Dicer: RNaza endonukleaza III u citoplazmi, Drosha: RNaza endonukleaza III u jezgri, m<sup>7</sup>G: 7-metilgvanozin, Pol II: RNA polimeraza II, pre-miRNA: prekursorska miRNA, pri-miRNA: primarna miRNA, RanGTP: kompleks sastavljen od proteina Ran i gvanozin trifosfata, RISC: RNA-inducirani utišavački kompleks, TRBP: TAR RNA vezujući protein

#### 4.2.2. Mehanizam djelovanja miRNA molekula

Lanac vodič usmjerava miRISC kompleks na ciljnu mRNA što rezultira utišavanjem gena za istu inhibicijom translacije ili posredovanjem njene degradacije. Prepoznavanje ciljne mRNA



temelji se na specifičnoj interakciji između „seed“ regije (2-8 nt) na 5' kraju miRNA i 3' UTR regije mRNA (Fabian i sur., 2010).

Stupanj komplementarnosti navedene interakcije određuje daljnju sudbinu mRNA. Što je ovaj stupanj veći, veća je vjerojatnost da će doći do degradacije mRNA, dok u suprotnom slučaju dolazi do inhibicije translacije što onemogućuje nastanak funkcionalnog proteina. Degradaciju mRNA posreduje miRISC kompleks endonukleolitičkom aktivnošću Ago proteina, no u većini slučajeva češća je djelomična komplementarnost između miRNA i mRNA te posljedična inhibicija translacije (Bushati i Cohen, 2007).

Proces translacije dijeli se na inicijaciju, elongaciju i terminaciju. Inicijacija u eukariota započinje formiranjem preinicijacijskog kompleksa i to vezanjem eukariotskih inicijacijskih čimbenika (engl. eukaryotic initiation factors, eIF) za malu ribosomsku podjedinicu 40S pri čemu se eIF2 veže na inicijatorsku metionil-tRNA (Cooper i Hausman, 2010). Elongacijski čimbenici eIF4A, eIF4E, i eIF4G dio su eIF4F kompleksa. eIF4E prepoznaje kapu na 5' kraju mRNA, dok se eIF4G i eIF3 vežu na protein koji veže poli-A (engl. poly-A binding protein, PABP), koji se pak veže na poli-A rep na 3' kraju mRNA. Posljedica ovog procesa, nužnog za učinkovitu translaciju, je cirkularizacija mRNA i formiranje petlje (Dalmay, 2013; Wahid i sur., 2010; Cooper i Hausman, 2010).

Kompleks miRISC ulazi u kompeticiju s inicijacijskim čimbenikom eIF4E za vezanje na 5' kraj ciljane mRNA čime se inhibira inicijacija translacije. Drugi model predlaže mehanizam inhibicije inicijacije u kojem miRISC kompleks sprječava cirkularizaciju mRNA, dok treći model objašnjava mehanizam inhibicije koji onemogućava povezivanje 60S podjedinice ribosoma s 40S preinicijacijskim kompleksom. Naime, inhibicija translacije rezultat je nemogućnosti vezanja velike podjedinice ribosoma na malu, ukoliko je na nju vezana ciljna mRNA (Wahid i sur., 2010).

U nekim slučajevima, razgradnja mRNA posredovana je deadenilacijom i uklanjanjem m<sup>7</sup>G kape koja se odvija pomoću egzoribonukleaznog deadenilacijskog kompleksa (Gebert i MacRae, 2019).

Bitno je napomenuti kako jedna miRNA može regulirati ekspresiju više ciljnih mRNA, dok svaka mRNA može biti regulirana višestrukim miRNA molekulama (Cai i sur., 2009).

### **4.3. MiRNA kao potencijalni terapeutici u KOPB-u**

#### **4.3.1. Terapeutici sintetizirani na temelju miRNA**

Patološki narušena regulacija miRNA može se modulirati obnavljanjem funkcije nedovoljno eksprimiranih, odnosno inhibicijom prekomjerno eksprimiranih miRNA molekula. Prva uspješna primjena miRNA kao eksperimentalnog terapeutika postignuta je u liječenju infekcije virusom hepatitisa C (HCV). Miravirsen je antisense oligonukleotid sa specifičnošću vezanja za miR-122 stabilizirajući je tako formiranjem heterodupleksa. Na ovaj način blokirana je funkcija miR-122 i spriječena progresija HCV u jetri. Uspjeh faze I i II kliničkih ispitivanja ovog potencijalnog lijeka postavilo je kamen temeljac za razvoj miRNA kao terapeutika u liječenju raznih bolesti (Osei i sur., 2015).

Obnova funkcije nedovoljno eksprimiranih miRNA molekula moguća je upotrebom dvolančanih, sintetičkih, oligonukleotidnih miRNA mimetika (engl. miRNA mimics) ili pak primjenom genskih vektora (Osei i sur., 2015). Kemijski sintetizirani miRNA mimetici sastavljeni su od dva lanca, vodiča i putnika, koji ne odgovaraju u potpunosti izvornom miRNA dupleksu. Naime, stabilnosti radi, lanac vodič u potpunosti je komplementaran zreloj miRNA, odnosno sadrži istovjetan genetički kod, dok su za lanac putnik vezane različite molekule, primjerice kolesterol, olakšavajući tako unos miRNA mimetika u ciljne stanice (Ivošević i sur., 2018; Lima i sur., 2018). Dvolančane miRNA molekule procesuirane su endogenim mehanizmima obrade miRNA i integrirane u RISC kompleks s ciljem utišavanja translacije ciljne mRNA. Neučinkovita dostava mimetika do ciljnih stanica glavna je mana ove metode, no poznate su dvije strategije kojima bi se mogao riješiti problem. Jedna od njih podrazumijeva povezivanje mimetika s antitijelima obloženim česticama, dok druga predlaže sustav isporuke temeljen na liposomima (Maltby i sur., 2016).

Primjena ekspresijskih vektora alternativni je pristup koji osigurava stabilnu i dugotrajnu miRNA ekspresiju te pruža mogućnost usmjerenja vektora u određene stanične tipove ili pak može potaknuti ekspresiju željene miRNA upotrebom specifičnih promotora (Maltby i sur., 2016).

Inhibicija prekomjerno eksprimiranih miRNA molekula moguća je upotrebom miRNA spužve ili jednolančanim antisense oligonukleotidima koji se nazivaju antagomiri (Maltby i sur., 2016).

Tehnologija koja koristi miRNA spužve temelji se na ekspresiji mRNA molekula s komplementarnim veznim mjestima koja sadrže ponavljanja za ciljane miRNA. Na ovaj način mRNA funkcioniraju kao mamac ili spužva koji će uhvatiti željene miRNA molekule u specifičnu konfiguraciju i tako očuvati funkciju mRNA. Navedeni pristup intenzivno se primjenjuje za inhibiciju miRNA molekula *in vitro*, dok je njegova primjena *in vivo* ograničena (Ivošević i sur., 2018; Lima i sur., 2018).

Antagomiri, još poznati kao anti-miR, kemijski su proizvedeni jednolančani antisense oligonukleotidi namijenjeni za utišavanje ekspresije ciljane miRNA molekule na temelju komplementarnog vezanja. Kako bi se ostvarili željeni afinitet vezanja, biostabilnost i farmakokinetička svojstva, potrebne su kemijske modifikacije. Većinom se uvode na šećerni prsten pri čemu C2' pozicija određuje njegovu konformaciju. Modifikacije na toj poziciji mogu promijeniti konformaciju šećernog dijela iz C2'-endo, karakterističnu za DNA duplekse, u C3'-endo specifičnu za RNA duplekse čime se postiže povećan afinitet antagomira za komplementarnu miRNA molekulu (Ivošević i sur., 2018; Lima i sur., 2018).

Oligonukleotidni terapeutici obećavajući su novi lijekovi, posebice u liječenju respiratornih bolesti, ponajviše radi mogućnosti primjene putem dišnih puteva i minimalne sistemske toksičnosti. Svakako, potrebne su dodatne studije i pretklinička ispitivanja kako bi se ostvario napredak u smislu poboljšanja isporuke lijekova, povećanja njihove učinkovitosti i smanjenja toksičnosti (Liao i sur., 2017).

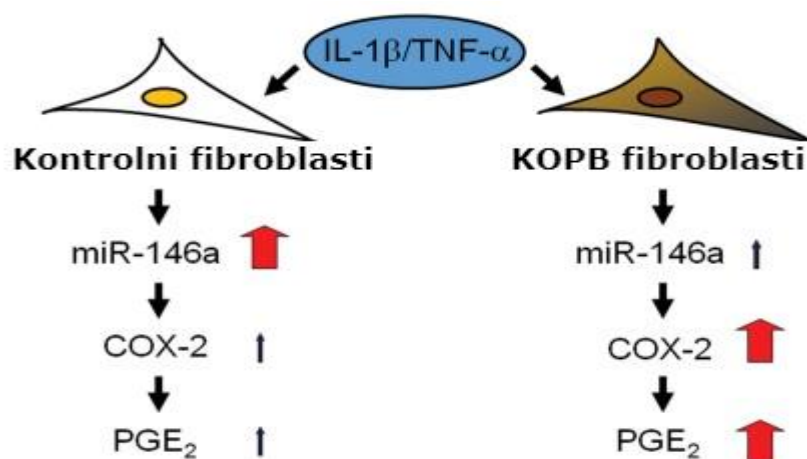
#### **4.3.2. MiRNA molekule uključene u patogenezu KOPB-a**

- **MikroRNA-146a**

Prostaglandin E2 (engl. prostaglandine E2, PGE2) derivat je arahidonske kiseline uključen u razne fiziološke i patološke procese u organizmu, a mogu ga producirati gotovi svi stanični tipovi (Kawahara i sur., 2015). U plućima inhibira proliferaciju i migraciju fibroblasta, odlaganje kolagena i diferencijaciju miofibroblasta, stoga je povećana produkcija PGE2 u plućnim fibroblastima pacijenata s KOPB-om od velikog interesa (Huang i sur., 2007).

U studiji koju su proveli Sato i sur. ispitivana je povezanost ekspresije miR-146a i produkcije prostaglandina E2 u fibroblastima izoliranim iz plućnog tkiva pacijenata oboljelih od KOPB-a u odnosu na kontrolne fibroblaste osoba slične dobi i pušačke povijesti koji nisu razvili KOPB (Sato i sur., 2010). Poznato je kako interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )

i čimbenik nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) sinergistički stimuliraju otpuštanje prostaglandina E2 u izloženim fibroblastima (Elias i sur., 1987). Istraživanje je pokazalo kako fibroblasti pacijenata s KOPB-om, nakon stimulacije IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  proizvode više PGE2 u odnosu na fibroblaste kontrolne skupine (Sato i sur., 2010). Povećana produkcija PGE2 je uzrokovana povećanom ekspresijom inducibilne COX-2, odnosno povećanom ekspresijom mRNA koja kodira za COX-2 (COX-2 mRNA). Stimulacija IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$  je inducirala i ekspresiju miRNA-146a u fibroblastima pacijenata s KOPB-om, ali smanjeno u odnosu na indukciju ekspresije miR-146a u fibroblastima kontrolne skupine. S obzirom da je miR-146a komplementarna 3' UTR regiji COX-2 mRNA i izravno se veže na nju, nameće se mehanizam u kojem reducirana ekspresija miR-146a u fibroblastima pacijenata s KOPB-om vodi do smanjene degradacije COX-2 mRNA, što rezultira povećanom ekspresijom COX-2, odnosno povećanom produkcijom PGE2, medijatora upale (Slika 3) (Sato i sur., 2010).



Slika 3. Shematski prikaz razlike u odgovoru na stimulaciju upalnim citokinima između kontrolnih fibroblasta i fibroblasta pacijenata s KOPB-om (preuzeto i prilagođeno prema Sato i sur. (2016) uz dopuštenje izdavača).

COX-2: ciklooksigenaza 2, IL-1 $\beta$ : interleukin 1 $\beta$ , PGE2: prostaglandin E2, TNF- $\alpha$ : čimbenik nekroze tumora  $\alpha$

Ovaj mehanizam potvrđen je pokusom u kojem je transfekcija fibroblasta miR-146a mimetikom smanjila stabilnost COX-2 mRNA, ekspresiju COX-2 i produkciju PGE2. Suprotno tome, miR-146a inhibitor povećao je stabilnost COX-2 mRNA u kontrolnim fibroblastima. Uloga miR-146a u regulaciji ekspresije COX-2 kasnije je potvrđena vezanjem miR-146a na 3' UTR regiju COX-2 mRNA. Rezultati provedenog istraživanja

ukazuju na terapijski potencijal mimetika miR-146a kao regulatora upale posredovane PGE2 u fibroblastima te na njihovu ulogu u remodeliranju i obnovi tkiva oštećenog upalom (Sato i sur., 2010).

S druge strane, fokus nedavno provedenog istraživanja bio je usmjeren na utjecaj ekspresije miR-146a u ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama i alveolarnim stanicama tipa II na njihovu proliferaciju i apoptozu. Naime, transfekcijom ljudskih bronhijalnih epitelnih stanica miR-146a mimetikom, uočena je povećana ekspresija proapoptotskih proteina p53 i Bax, dok je ekspresija Bcl-2 proteina bila snižena. Suprotno tomu, miR-146a inhibitor utjecao je na smanjenje ekspresije p53 i Bax proteina, dok je izmjerena razina Bcl-2 proteina bila povišena. S obzirom na dobivene rezultate možemo zaključiti kako miR-146a modulacijom ekspresije p53, Bax i Bcl-2 proteina utječe na proliferaciju i programiranu smrt stanica (N. Li i sur., 2021). U idućem ispitivanju, stanice su tretirane deksmedetomidinom, visoko selektivnim agonistom  $\alpha 2$ -adrenergičkih receptora sa širokom primjenom u intenzivnoj njezi i anesteziologiji zahvaljujući sedativnom, analgetskom i anestetičkom djelovanju (P. Li i sur., 2019). Nakon primjene deksmedetomidina, u oba tipa stanica zabilježena je smanjena ekspresija miR-146a. Ekspresija p53 i Bax proteina također je bila snižena, dok je razina proteina Bcl-2 bila povišena. Dobiveni rezultati sugeriraju kako su deksmedetomidinom inducirana proliferacija i reducirana apoptoza ispitivanih stanica potencijalno rezultat njegova utjecaja na ekspresiju miR-146a. *In vitro* ispitivanja učinka deksmedetomidina na ekspresiju miR-146a potvrđena su *in vivo* ispitivanjem. Aplikacijom deksmedetomidina, zabilježeno je sniženje upalnih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu animalnog modela za KOPB. Na temelju ovih podataka možemo zaključiti kako bi deksmedetomidin modulacijom ekspresije miR-146a mogao ublažiti fenotipska obilježja i simptome KOPB-a (N. Li i sur., 2021). S obzirom da je riječ o lijeku komplicirane farmakodinamike i farmakokinetike potrebna su dodatna istraživanja koja bi opravdala njegovu primjenu ukoliko korist terapije premašuje njen rizik.

- **MikroRNA-150**

Xue i Li nastojali su ispitati utjecaj miR-150 na dimom cigarete induciranu upalu pluća, *in vivo* koristeći animalni model miša te *in vitro* upotrebom BEAS-2B stanične kulture dobivene iz normalnog ljudskog bronhijalnog epitela. Dobiveni rezultati pokazali su kako je ekspresija miR-150 značajno smanjena u plućima miševa izloženih dimu cigarete, kao i

u stanicama tretiranima ekstraktom dima cigarete u odnosu na kontrolne stanice. S druge strane, dostava miR-150 mimetika za posljedicu je imala smanjenje broja neutrofila, limfocita i makrofaga te redukciju koncentracije proupalnih citokina IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  u bronhoalveolarnom ispirku čije su vrijednosti inače povišene uslijed izlaganja dimu cigarete. S obzirom na navedeno, možemo zaključiti kako u KOPB-u povezanom s pušenjem miR-150 djeluje protuupalno. Ovu tvrdnju potkrjepljuje i činjenica da je u BEAS-2B stanicama tretiranima ekstraktom dima cigarete povišena ekspresija miR-150 inhibirala aktivnost NF- $\kappa$ B, čimbenika odgovornog za transkripciju mnogih proupalnih citokina. Kao ciljni gen za miR-150 identificiran je p53, regulator stanične apoptoze, čija je regulacija bila smanjena uslijed povišene ekspresije ove miRNA u ispitivanim stanicama. Na temelju ovog saznanja možemo pretpostaviti kako bi miR-150 utjecajem na p53 mogla djelovati protektivno na ekstraktom dima cigarete induciranu apoptozu bronhijalnih epitelnih stanica (Xue i Li, 2018).

Budući da miR-150 djeluje protuupalno i ublažava apoptozu epitelnih stanica dišnih putova uzrokovanu ekstraktom cigaretnog dima, ciljna dostava mimetika miR-150 može predstavljati potencijalnu terapijsku strategiju u liječenju KOPB-a povezanog s pušenjem.

- **MikroRNA-145-5p**

U plućnim uzrocima pušača s KOPB-om, ali i onih koji nisu razvili KOPB, te u ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama izloženima dimu cigarete, razina miR-145-5p bila je snižena. Pretpostavljena uloga ove molekule kontrola je apoptoze i upale kroz supresiju p53 i smanjenje ekspresije cijepane kaspaze 3/9. Navedena miRNA veže se za 3' UTR regiju mRNA za Kruppel-sličan čimbenik 5 (engl. Kruppel-like factor, KLF5) s ciljem utišavanja njene genske ekspresije. KLF-5 sudjeluje u patogenezi KOPB-a induciranoj dimom cigarete promovirajući nuklearnu translokaciju p65 podjedinice NF- $\kappa$ B, rezultirajući tako povećanjem razine IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ . Mimetici miR-145-5p učinkovito su reducirali ekspresiju KLF5, p53 i cijepane kaspaze 3/9, smanjili su translokaciju p65 podjedinice NF- $\kappa$ B i produkciju proupalnih citokina u ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama izloženima ekstraktu dima cigarete. Studija koju su proveli Dang i suradnici sugerira kako miR-145-5p ima protektivnu ulogu u dimom cigarete induciranoj apoptozu epitelnih stanica dišnih puteva i upali, djelomično regulacijom KLF-5 posredovane aktivacije NF- $\kappa$ B signalnog puta, što pruža još jednu terapijsku mogućnost u liječenju dimom cigarete induciranoj KOPB-a (Dang i sur., 2019; Mei i sur., 2020).

- **MikroRNA-206**

U ljudskim plućnim mikrovaskularnim endotelnim stanicama tretiranim ekstraktom dima cigarete zabilježena je povišena ekspresija miR-206 koja korelira s ekspresijskim profilom kaspaze-3, kaspaze-9 i Bcl-2 te pridonosi apoptozi. Bioinformatička analiza istaknula je Notch3 i vaskularni endotelni faktor rasta-A (engl. vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) kao ciljne mete za miR-206. Notch3 promovira proliferaciju ljudskih stanica glatkih mišića pulmonarnih arterija, dok VEGF-A inducira proliferaciju i adheziju endotelnih stanica, što implicira njihovu ulogu u vaskularnom remodeliranju tijekom KOPB-a. Inhibicijom Notch3 i VEGF-A u ljudskim plućnim mikrovaskularnim endotelnim stanicama, miR-206 promovira staničnu apoptozu. Štoviše, u plućnom tkivu pacijenata s KOPB-om također je opažena povišena ekspresija miR-206 i njena negativna korelacija s razinom Notch3 i VEGF-A. Buduće studije zahtijevaju detaljnije određivanje uloge miR-206 u KOPB-u primjenom *in vivo* animalnih modela, no provedeno istraživanje istaknulo je miR-206 kao potencijalnu terapijsku metu u liječenju KOPB-a (Mei i sur., 2020; Sun i sur., 2019).

- **MikroRNA-212-5p**

Usporedbom sa zdravom kontrolnom skupinom, u plućnom tkivu pacijenata s KOPB-om zabilježena je snižena ekspresija miR-212-5p. Također, ekspresija je bila snižena i u bronhijalnim epitelnim stanicama tretiranim ekstraktom dima cigarete. MiR-212-5p promovira staničnu proliferaciju te inhibira ekspresiju proteina 3 koji veže čimbenik rasta sličan inzulinu (engl. insulin like growth factor binding protein 3, IGFBP3), inače inducirano dimom cigarete. Naime, tretiranje bronhijalnih epitelnih stanica ekstraktom dima cigarete induciralo je povećanje ekspresije IGFBP3, no ono je inhibirano primjenom mimetika miR-212-5p. S obzirom na ulogu IGFBP3 u remodeliranju i upali dišnih puteva, inhibicijom ovog proteina miR-212-5p manifestira svoju protektivnu funkciju u KOPB-u i kao takva predstavlja potencijalnu buduću terapijsku metu (Jia i sur., 2018).

- **Let-7c**

Analiza ekspresije miRNA u studiji koju su proveli Van Pottelberge i sur. otkrila je značajno nižu razinu let-7c kod pacijenata s KOPB-om u odnosu na nepušače i pušače koji nisu razvili KOPB. Nadalje, proteinska razina TNF receptora II (engl. TNF receptor II, TNFR-II), inače ciljne mete let-7c molekule, bila je povišena, odnosno inverzno je korelirala s njenom ekspresijom (van Pottelberge i sur., 2011). Naime, TNFR-II uključen je u KOPB

patogenezu, što potvrđuje studija u kojoj je utišavanje njegove ekspresije imalo protektivni učinak na mišji model u odnosu na dimom cigarete induciranu upalu i nastanak emfizema (de Smet i sur., 2015). S obzirom na navedeno, let-7c mimetici interesantna su potencijalna terapijska meta u liječenju KOPB-a.

#### 4.4. MiRNA kao potencijalni biomarkeri u KOPB-u

MiRNA molekule iznimno su stabilne i visoko eksprimirane u tjelesnim tekućinama što ih čini odličnim potencijalnim kandidatima za dijagnostiku i praćenje progresije bolesti (Roffel i sur., 2020). Molekula miR-21 prvi je otkriveni serumski biomarker. Naime, u pacijenata s B-staničnim limfomom detektirana je njena povišena serumska razina (Akbas i sur., 2012; Lawrie i sur., 2008). Dodatno, otkriveno je kako serumska razina miR-141 pomaže u identifikaciji pacijenata s rakom prostate, dok se u nekim tipovima karcinoma povišena ekspresija određenih miRNA molekula smanjila nakon uklanjanja tumorskog tkiva, a opetovano povećanje zabilježeno je pri ponovnoj pojavi karcinoma (Akbas i sur., 2012; Chen i sur., 2008).

U serumu pacijenata s KOPB-om detektirano je 5 diferencijalno eksprimiranih miRNA molekula u odnosu na zdravu kontrolu skupinu, pri čemu je ekspresija miR-34c-5p, miR-20a, miR-28-3p i miR-100 bila snižena, a miR-7 povišena. Navedene miRNA molekule uključene su u patogenezu KOPB-a i kao takve predstavljaju potencijalne biomarkere bolesti (Akbas i sur., 2012).

Rezultati provedenih istraživanja i same karakteristike ekspresije miRNA, nametnuli su ove male nekodirajuće molekule kao nove korisne biomarkere za dijagnozu, praćenje i predikciju razvoja raznih bolesti, uključujući KOPB.

- **MikroRNA-29b**

U plućima i plazmi pacijenata s KOPB-om snižena je razina miR-29b. Ova molekula povezana je s razvojem upale i plućnom funkcijom, a njena meta je protein 4 koji sadrži bromodomen (engl. bromodomain protein 4, BRD4) čija je ekspresija povišena u plućima pacijenata s KOPB-om (Tang i sur., 2019). Naime, BRD4 je član obitelji proteina s bromodomenom i ekstraterminalnom domenom (engl. bromodomain and extraterminal domain protein family, BET), a ima pleiotropnu ulogu u epigenetičkoj kontroli ekspresije gena upalnog odgovora (Xu i sur., 2021). U plućima pacijenata detektirana je i povišena razina IL-8, a rezultati *in vitro* provedene studije ukazuju na važnost osovine miR-29b/BRD4/IL-8 u patogenezi KOPB-a. Ovim istraživanjem otvara se mogućnost posredne



uloge miR-29b u kontroli upale dišnih putova u KOPB-u regulacijom dimom inducirane ekspresije IL-8 ciljajući BRD4 protein u bronhijalnim epitelnim stanicama čime bi miR-29 mogla postati nova terapijska meta. S obzirom da plazmatska miR-29b korelira s plućnom, otvara se mogućnost korištenja miR-29b kao potencijalnog biomarkera stupnja bolesti (Tang i sur., 2019).

- **Omjer miR-21/miR-181a**

U serumu pušača i pacijenata s KOPB-om povišena je razina miR-21, dok je ekspresija miR-181a bila snižena, a njihov međusobni omjer negativno korelira s progresijom bolesti, procijenjeno prema GOLD stadijima. Stoga, visok omjer serumske ekspresije miR-21 i miR-181a može biti rizični čimbenik za razvoj KOPB-a te bi mogao biti koristan za predviđanje tijeka razvoja bolesti u asimptomatskih pušača (Xie i sur., 2014).

- **MikroRNA-125b**

Studija koju su proveli Hu i sur. predstavlja miR-125b kao potencijalni novi biomarker za dijagnozu akutnih egzacerbacija KOPB-a. Naime, ova cirkulirajuća miRNA molekula promovira upalni odgovor utjecajem na povećanje razine upalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-8 i leukotriena B4 (LTB4), presudnih za inicijaciju i progresiju egzacerbacija. Štoviše, riječ je o hipoksijom reguliranoj miRNA molekuli koja inducira remodeliranje plućnog tkiva regulirajući apoptozu plućnih epitelnih stanica što doprinosi akutnom pogoršanju bolesti. Cirkulirajuća miR-125b molekula, kao proupalni čimbenik, mogla bi postati novi biomarker ključan za učinkovitu prevenciju, ranu dijagnozu i liječenje akutnih egzacerbacija (Hu i sur., 2017).

- **MikroRNA-15b-5p**

Preklapanje astme i KOPB-a (engl. asthma-COPD overlap, ACO) heterogeno je stanje koje opisuje pacijente s trajnim ograničenjem protoka zraka te kliničkim i upalnim karakteristikama i astme i KOPB-a. Naime, kod nekih bolesnika s KOPB-om može se prepoznati dominantan tip 2 upale u kombinaciji sa značajnom reverzibilnošću i eozinofilijom u krvi i dišnim putevima. S druge strane, pacijenti s dijagnosticiranom astmom i značajnom ekspozicijom dimu cigarete, mogu manifestirati neke karakteristike KOPB-a, poput opstrukcije protoka zraka i emfizematoznih lezija na plućima. U kliničkoj praksi problematično je dijagnosticiranje, no kontroverze se vežu i uz definiciju i patofiziologiju ovog stanja (Fouka i sur., 2022).

Hirai i sur. proveli su istraživanje kojim su ustanovili kako su plazmatski ekspresijski profili 5 miRNA molekula (miR-148a-3p, miR-15b-5p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-26b-5p) sniženi u pacijenata s preklapanjem u odnosu na pacijente pojedinačno oboljele od astme ili KOPB-a. Među ovim miRNA molekulama, kao novi potencijalan biomarker, istaknula se miR-15b-5p čija je ekspresija bila najodrživija u identifikaciji pacijenata s ACO. Prethodno su kao biomarkeri korišteni periostin i protein 1 sličan kitinazi-3 (engl. chitinase-3-like protein 1, YKL-40), no kombinirani pristup s miR-15b-5p pridonosi preciznijoj karakterizaciji ovog kompleksnog stanja. Rezultati provedene studije, osim što su pružili potencijalan biomarker, kreirali su uporište za daljnje proučavanje patofizioloških značajki preklapanja astme i KOPB-a (Hirai i sur., 2021).

## **4.5. Izvanstanične vezikule i miRNA u KOPB-u**

### **4.5.1. Otkriće, biogeneza i funkcija izvanstaničnih vezikula**

Spoznaje o izvanstaničnim vezikulama datiraju iz 1967. godine kada je znanstvenik Peter Wolf zamijetio kako iz aktiviranih trombocita nastaju čestice veličine 20-50 nm koje doprinose koagulaciji (Wolf, 1967). Njegovo otkriće pobudilo je interes znanstvene zajednice, no ove čestice u desetljećima koja slijede mnogima ostaju nedoumica.

Prekretnica u proučavanju izvanstaničnih vezikula dogodila se 1983. godine kada su dvije nezavisne istraživačke grupe objavile svoja zapažanja o sazrijevajućim retikulocitima koji u izvanstanični prostor otpuštaju vezikule promjera 50 nm u kojima se nalaze transferinski receptori, inače prisutni na membrani retikulocita (Harding i sur., 1983; Pan i Johnstone, 1984; Pan i Johnstone, 1983).

U kasnijim godinama, do izražaja je došla uloga izvanstaničnih vezikula kao prijenosnika genetičkog materijala. Naime, otkriveno je kako vezikule porijeklom iz mastocita sadrže mRNA i miRNA, što ukazuje na njihovu ulogu u međustaničnom prijenosu genetičke informacije (Lässer i sur., 2012; Valadi i sur., 2007).

Naziv "izvanstanične vezikule" širok je pojam koji se odnosi na različite tipove vezikula koje se potom, na temelju njihove veličine i biogeneze, dijele na egzosome, mikrovezikule i apoptotička tijela (Théry i sur., 2018; Thietart i Rautou, 2020).

Egzosomi su membranom okružene izvanstanične vezikule promjera 50-150 nm karakterizirane endosomalnim porijeklom (Hough i sur., 2017). Njihova biogeneza započinje

invaginacijom stanične membrane čime nastaju rani endosomi. Sazrijevanjem ranih formiraju se kasni endosomi sinonima multivezikularna tijela (engl. multivesicular bodies, MVBs). Tijekom ovog procesa, uvrtačenjem membrane endosoma prema unutra, nastaju intraluminalne vezikule (engl. intraluminal vesicles, ILVs) koje sadrže proteine i nukleinske kiseline. One se nalaze unutar multivezikularnih tijela te se fuzijom sa staničnom membranom otpuštaju u izvanstanični prostor kao egzosomi ili se pak razgrade fuzijom s lizosomima (Barile i Vassalli, 2017; Hough i sur., 2017; Thietart i Rautou, 2020). Sadržaj proteina i RNA molekula unutar egzosoma razlikuje se u odnosu na stanice od kojih su nastali što upućuje na selektivno punjenje koje omogućuje generiranje egzosoma točno određenog sastava (Valadi i sur., 2007).

Mikrovezikule, prethodno zvane mikročestice, veličine su od 100/200 nm do 1000 nm, a nastaju pupanjem stanične membrane prema van (Thietart i Rautou, 2020). S obzirom na to da se veličinom ponekad preklapaju s egzosomima, mehanizam biogeneze ostaje ključna razlika između ova dva tipa izvanstaničnih vezikula. Formiranje mikrovezikula rezultat je rearanžamane fosfolipidnog dvosloja i kontrakcije proteina citoskeleta. Naime, pupanje membrane, odnosno formiranje vezikula, inducirano je translokacijom fosfatidilserina u vanjski sloj fosfolipidnog dvosloja u čemu ključnu ulogu ima aminoglikozidna translokaza flopaza. Osim flopaze, transport fosfolipida u staničnoj membrani regulira i flipaza, odgovorna za njihov prijenos iz vanjskog u unutarnji sloj fosfolipidnog dvosloja. Kako bi se proces pupanja priveo kraju, ADP-ribozilacijski čimbenik 6 (engl. ADP-ribosylation factor 6, ARF6) pokreće signalnu kaskadu koja započinje aktivacijom fosfolipaze D (engl. phospholipase D, PLD) što regrutira kinazu reguliranu izvanstaničnim signalom (engl. extracellular signal-regulated kinase, ERK) u staničnu membranu. Ova kinaza fosforilira i aktivira kinazu lakog lanca miozina (engl. myosin light-chain kinase, MLCK) što posljedično dovodi do fosforilacije i aktivacije lakog lanca miozina te otpuštanja mikrovezikula (Akers i sur., 2013). Njihova površina, s obzirom na karakteristike biogeneze, obogaćena je biljezima specifičnim za stanice od kojih potječu. Ključni biljezi za identifikaciju mikrovezikula su ARF6 i VAMP3 (engl. vesicle-associated membrane protein 3) (Morrison i sur., 2016).

Za razliku od egzosoma i mikrovezikula koji nastaju tijekom normalnih staničnih procesa, apoptotska tijela nastaju isključivo apoptozom, odnosno procesom programirane stanične smrti (Akers i sur., 2013). Riječ je o membranom okruženim vezikulama raspona veličine od 50-5000 nm koje su ispunjene citoplazmom i fragmentima kromatina s ulogom u staničnoj signalizaciji (Hauser i sur., 2017).

Izvanstanične vezikule prepoznate su kao važni medijatori međustanične komunikacije koje proizvode gotovo sve stanice, a mogu se izolirati iz plazme, seruma, mokraće, sline, bronhoalveolarnog ispirka i drugih tjelesnih tekućina. Imaju sposobnost prijenosa bioloških signala između stanica čime mogu utjecati na fenotipska obilježja stanice primatelja. Signali se prenose putem raznih biomolekula poput proteina, lipida, šećera i nukleinskih kiselina, pri čemu im fosfolipidni dvosloj, koji okružuje vezikule, pruža zaštitu i sigurnu dostavu do ciljnih stanica. Nukleinske kiseline najzanimljivije su sastavnice izvanstaničnih vezikula, a posebno se ističu miRNA molekule koje na ovaj način mogu regulirati ekspresiju gena i sintezu proteina u udaljenim stanicama (Gomez i sur., 2022).

#### **4.5.2. Uloga izvanstaničnih vezikula u KOPB-u**

U normalnim fiziološkim uvjetima, proces izlučivanja izvanstaničnih vezikula ima protektivnu ulogu s ciljem održavanja homeostaze (O'Farrell i Yang, 2019). Izloženost bronhijalnih i epitelnih stanica raznim iritansima iz okoliša može pridonijeti povećanju sekrecije egzosoma koji sadrže specifične miRNA molekule. Osim utjecaja na broj otpuštenih egzosoma, stresori poput toplinskog šoka, hipoksije i izloženosti oksidansima, dodatno mogu promijeniti njihov sastav (Y. Li i sur., 2019).

Genschmer i sur. su proučavanjem enzimatskog tereta izvanstaničnih vezikula porijeklom iz polimorfonuklearnih leukocita otkrili kako sadrže neutrofilnu elastazu koja može razgraditi izvanstanični matriks i tako pridonijeti opstrukciji dišnih puteva (Genschmer i sur., 2019).

Mnogobrojne provedene studije ukazale su na proupalnu ulogu izvanstaničnih vezikula u KOPB-u. Kim i suradnici spoznali su kako vezikule porijeklom iz gram-negativnih bakterija, primjerice *E. coli*, induciraju nastanak emfizema putem IL-17A posredovane neutrofilne upale (Kim i sur., 2015), dok su Takahashi i sur. uočili negativnu korelaciju između povišenog broja cirkulirajućih izvanstaničnih vezikula i forsiranog ekspiratornog volumena (FEV<sub>1</sub>) (Takahashi i sur., 2014).

Tan i suradnici otkrili su kako je broj egzosoma u plazmi pacijenata oboljelih od KOPB-a povišen u odnosu na kontrolnu skupinu, s tim da je broj plazmatskih egzosoma bio najviši kod pacijenata s akutnom egzacerbacijom. Dodatno, njihovi rezultati podržali su teoriju o uključenosti egzosoma u upalni odgovor u KOPB-u s obzirom da je izmjerena razina egzosoma korelirala s plazmatskom razinom upalnih medijatora kao što su C-reaktivni protein (engl. C-

reactive protein, CRP), receptor-1 za topljivi čimbenik nekroze tumora- $\alpha$  (engl. soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor-1, sTNF $\alpha$ R1) i IL-6 (Tan i sur., 2017).

#### **4.5.3. Uloga egzosomalnih miRNA u razvoju KOPB-a**

MiRNA molekule jedna su od sastavnica izvanstaničnih vezikula s regulatornom ulogom u procesu stanične diferencijacije i utjecajem na fenotip stanice. Poremećena regulacija ekspresije ovih molekula povezana je s razvojem upalnih stanja u plućima (Fujita i sur., 2015). Sadržaj miRNA unutar izvanstaničnih vezikula znatno se razlikuje od onog unutar stanica od kojih su nastale što upućuje na to da postoje određeni mehanizmi sortiranja. Ovi mehanizmi uključuju proteine koji vežu RNA, na primjer hnRNPA2B1, potom membranske proteine uključene u biogenezu izvanstaničnih vezikula, primjerice kaveolin-1, te post-transkripcijske RNA modifikacije kao što je uridinilacija na 3' kraju. Dokazano je kako sadržaj izvanstaničnih vezikula može utjecati na gensku ekspresiju i biološke procese, između ostalog i na imunski odgovor, u stanicama primateljima, a međustanična izmjena miRNA putem vezikula uključena je u široki spektar patofizioloških procesa, uključujući razvoj KOPB-a (Reid i sur., 2021).

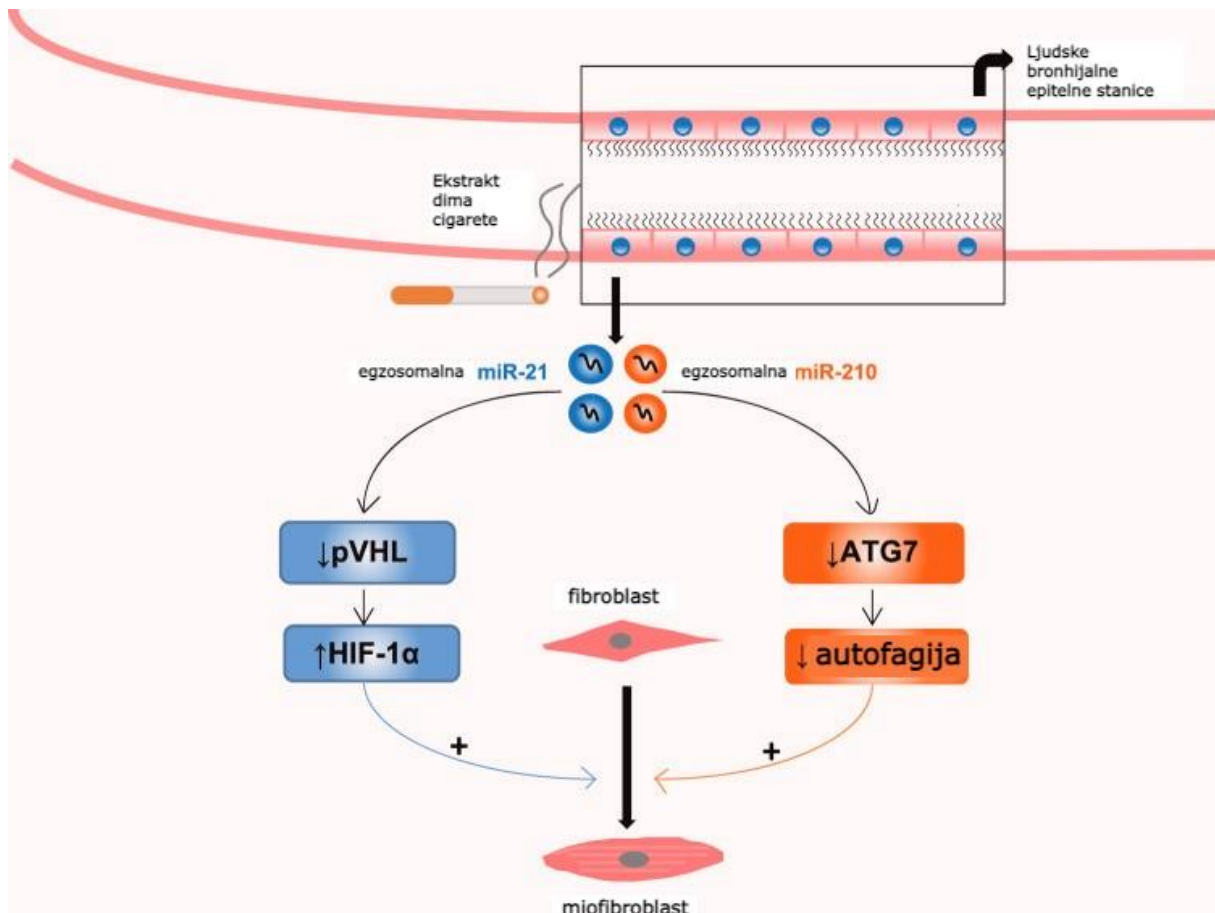
Stimulansi kao što je ekstrakt dima cigarete, osim što mogu utjecati na broj egzosoma, također mogu promijeniti ekspresijski profil egzosomalnih miRNA. Naime, Xu i suradnici uočili su povišenu ekspresiju miR-21 u egzosomima nastalim iz ljudskih bronhalnih epitelnih stanica tretiranim ekstraktom dima cigarete u odnosu na egzosome stanica koje nisu bile izložene istom tretmanu (H. Xu i sur., 2018).

Dodatno, neke studije pokazale su kako abnormalna izmjena informacija između bronhijalnog epitela i bronhijalnih fibroblasta, posredovana egzosomalnim miR-21 i miR-210, rezultira diferencijacijom fibroblasta u miofibroblaste (Slika 4). Miofibroblasti porijeklom iz fibroblasta sudjeluju u remodeliranju dišnih puteva proizvodnjom komponenti izvanstaničnog matriksa, primjerice kolagena i  $\alpha$ -aktina glatkih mišića (engl.  $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), koji im osiguravaju snažnu kontraktilnu aktivnost (Hinz i sur., 2012; Y. Li i sur., 2019; Michalik i sur., 2018).

Fujita i sur. otkrili su kako ekstraktom dima cigarete inducirane izvanstanične vezikule porijeklom iz ljudskih bronhijalnih epitelnih stanica posreduju komunikaciju ovih stanica s plućnim fibroblastima. Naime, u epitelnim stanicama i njihovim izvanstaničnim vezikulama povišena je ekspresija miR-210 koja izravno inhibira Atg7 (engl. autophagy related protein). Inhibicija navedenog proteina rezultira supresijom autofagije što za posljedicu ima

diferencijaciju plućnih fibroblasta u miofibroblaste. Dodatno, ekstraktom dima cigarete inducirana egzosomalna miR-210 može povećati ekspresiju  $\alpha$ -SMA i kolagena tipa I u plućnim fibroblastima što pridonosi diferencijaciji miofibroblasta (Fujita i sur., 2015).

Slično tomu, prijenos miR-21 putem egzosoma iz bronhijalnih epitelnih stanica u plućne fibroblaste u uvjetima hipoksije uzrokuje povećanje aktivnosti transkripcijskog čimbenika HIF-1 $\alpha$  (engl. hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) ciljajući von Hippel-Lindau protein (pVHL) što povećava razinu  $\alpha$ -SMA i kolagena tipa 1 inducirajući tako miofibroblastni fenotip (Xu i sur., 2018).



Slika 4. Uloga egzosomalnih miRNA molekula u diferencijaciji fibroblasta u miofibroblaste (preuzeto i prilagođeno prema Y. Li i sur. (2019) uz dopuštenje izdavača).

Atg7: protein povezan s autofagijom, HIF-1 $\alpha$ : hipoksijom induciran čimbenik 1 $\alpha$ , pVHL: von Hippel-Lindau protein ↓: reducirano, ↑: povišeno, +: promovirati

Oksidacijski stres doprinosi razvoju fibroze malih dišnih putova i može dodatno potaknuti starenje fibroblasta. Ključnu poveznicu između oksidacijskog stresa i ubrzanog staničnog starenja predstavljaju miRNA molekule. Naime, u epitelnim stanicama malih dišnih puteva

pacijenata s KOPB-om izloženim oksidacijskom stresu putem dima cigarete ili dima biomase, povišena je ekspresija miR-34a uz istovremenu sniženu razinu antioksidacijskih molekula sirtuina-1 i sirtuina-6. Dodatno, povišena je i ekspresija miR-570. U fibroblastima malih dišnih putova KOPB pacijenata također je povišena ekspresija miR-34a i miR-570 uz povećane biljege starenja i sniženu razinu sirtuina-1. Moguće je da se u pozadini krije mehanizam kojim epitelne stanice malih dišnih putova izložene oksidacijskom stresu u lumen dišnih puteva oslobađaju vezikule koje sadrže miR-34a i miR-570, potom preuzete od strane fibroblasta, doprinoseći tako ubrzanom starenju i fibrozi. Specifični antagomiri koji blokiraju ove miRNA mogli bi obnoviti normalnu razinu sirtuina, reducirati sekreciju markera staničnog starenja i regenerirati stanični rast, stoga predstavljaju potencijalnu terapijsku opciju u liječenju KOPB-a uz upotrebu izvanstaničnih vezikula za njihovu dostavu (Barnes, 2019).

#### **4.5.4. Izvanstanične vezikule kao potencijalni biomarkeri u KOPB-u**

Izvanstanične vezikule prepoznate su kao novi atraktivni biomarker za dijagnozu i praćenje progresije KOPB-a zbog njihovog posredovanja u međustaničnoj komunikaciji putem bioaktivnog tereta. Ovaj teret može sadržavati molekularne informacije, najčešće proteine i nukleinske kiseline, koje odražavaju trenutno fiziološko stanje stanice od koje su vezikule nastale što ih čini pouzdanim parametrom za praćenje tijeka bolesti. Tomu doprinosi njihova dostupnost u različitim tjelesnim tekućinama te stabilnost u izvanstaničnom mediju s obzirom na fosfolipidni dvosloj koji ih štiti od razgradnje (Kadota i sur., 2016; O'Farrell i sur., 2021). Shen i sur. analizirali su diferencijalno eksprimirane egzosomalne miRNA molekule u plazmi pacijenta oboljelih od KOPB-a i u zdravih pojedinaca. Provedena studija istaknula je tri potencijalna miRNA kandidata koji se mogu koristiti kao biomarkeri za dijagnozu KOPB-a. Naime, ekspresija egzosomalnih miR-23a, miR-221 i miR-575 korelira s vrijednosti FEV<sub>1</sub>/FVC, stoga bi ove miRNA molekule mogle pružiti korisne informacije u pogledu dijagnostike bolesnika s KOPB-om (Shen i sur., 2021).

#### **4.5.5. Izvanstanične vezikule kao potencijalni terapeutici u KOPB-u**

Trenutno postoji nekoliko mogućih načina upotrebe izvanstaničnih vezikula u liječenju KOPB-a. Jedna od potencijalnih terapijskih strategija mogla bi biti uklanjanje vezikula koje sadrže nukleinske kiseline ili proteine kao medijatore međustanične komunikacije uključene u patogenezu bolesti ublažavajući tako nastalu upalu dišnih puteva. Primjerice, izlučivanje vezikula može biti suprimirano upotrebom GW4869, inhibitorom ekspresije neutralne

sfingomijelinaze-2 (Gon i sur., 2020). Ovaj enzim odgovoran je za razgradnju sfingomijelina u ceramide te je njegovom inhibicijom smanjeno ceramidima posredovano unutarnje pupanje multivezikularnih tijela i oslobađanje zrelih egzosoma (Essandoh i sur., 2015). Primjena GW4869 mogla bi imati potencijalne nuspojave, stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja u svrhu procjene koristi i rizika ovog pristupa (Gon i sur., 2020).

Novo područje interesa u pogledu liječenja KOPB-a predstavljaju izvanstanične vezikule porijeklom iz mezenhimalnih matičnih stanica (engl. mesenchymal stem cells, MSC) koje prijenosom genetičkog materijala i proteina mogu posredovati komunikaciju sa stanicama od interesa. Vodeći izvor ovih stanica s visokim potencijalom proliferacije i diferencijacije su koštana srž, pupčana vrpca i adipozno tkivo. Za izolaciju izvanstaničnih vezikula porijeklom iz MSC (MSC-EV) koriste se ultracentrifuga, setovi za izolaciju egzosoma i anionsko-izmjenjivačka kromatografija, dok se iz njih derivirane vezikule najčešće primjenjuju intratrahealno i intravenski (Ma i sur., 2022). Štoviše, prethodno provedene studije dokazale su potencijalnu terapijsku ulogu MSC-EV u terapiji KOPB-a. Naime, Maremanda i suradnici prijavili su kako egzosomi porijeklom iz mišjih MSC mogu ublažiti cigaretnim dimom induciranu upalu u mišjim i ljudskim epitelnim stanicama (Maremanda i sur., 2019). Jedan od mogućih mehanizama protuupalnog učinka MSC-EV je indukcija proliferacije i imunosupresivnog kapaciteta regulatornih T-limfocita povećanom regulacijom IL-10 i TGF- $\beta$ 1 ekspresije u perifernim krvnim mononuklearnim stanicama (Gon i sur., 2020).

Potrebno je provesti detaljna ispitivanja učinkovitosti i sigurnosti primjene MSC-EV u pacijenta s KOPB-om, no s obzirom na dokazani protuupalni učinak moguće je da se radi o novoj terapijskoj opciji za liječenje ove kronične plućne bolesti u budućnosti.

#### **4.5.6. Izvanstanične vezikule kao nosači lijekova**

Za dostavu terapijskih molekula do ciljnih stanica prethodno su korišteni sintetski liposomi i nanovezikule, no naponi da ih se učini biokompatibilnima i u potpunosti sigurnima za primjenu nisu postigli značajan uspjeh. Zahvaljujući niskoj imunogeničnosti i niskoj toksičnosti te visokoj mogućnosti modifikacije i permeabilnosti kroz biološke barijere, endogene izvanstanične vezikule predstavljaju novu atraktivnu opciju za transport terapeutika, posebice miRNA. Uzevši u obzir činjenicu da se radi o molekulama male veličine i težine, miRNA mogu biti učinkovito transfektirane u stanice općenito te u izvanstanične vezikule. Budući da su



miRNA molekule inkapsulirane u vezikule vrlo stabilne, tjelesnim tekućinama mogu putovati na velike udaljenosti bez da budu razgrađene izvanstaničnim nukleazama (Munir i sur., 2020).

Punjenje izvanstaničnih vezikula specifičnim miRNA molekulama moguće je na dva načina. Jedna od mogućnosti je produkcija stanične linije koja pojačano eksprimira željenu terapijsku miRNA, dok je druga opcija izolacija vezikula iz izvora (stanična linija / tjelesne tekućine) i transfekcija s izabranom miRNA molekulom, a najčešće korištena metoda za ovaj postupak je elektroporacija (Munir i sur., 2020).

Patologije poput raznih upalnih stanja pokazuju odstupanja u ekspresiji miRNA koja može biti ili povišena ili snižena, stoga primjena egzogenih miRNA mimetika ili inhibitora putem izvanstaničnih vezikula može pridonijeti obnovi normalne razine miRNA i posljedičnoj regulaciji upale. Prije upotrebe miRNA ukopljenih u izvanstanične vezikule u kliničkoj praksi, potrebno je razviti tehnike za njihovu preciznu analizu te točno odrediti doziranje i količinu miRNA potrebne za regulaciju ciljne mRNA u željenoj stanici (Munir i sur., 2020).

## 5. ZAKLJUČCI

- KOPB je kronična upalna bolest obilježena progresivnom opstrukcijom plućne funkcije, perzistentnim respiratornim simptomima i ograničenjem protoka zraka. Vodeći je uzrok morbiditeta i mortaliteta širom svijeta predstavljajući tako globalni zdravstveni problem.
- Izloženost polutantima iz okoliša i pušenje vodeći su rizični čimbenici za razvoj bolesti, a izraženi simptomi i razdoblja akutnog pogoršanja značajno narušavaju kvalitetu života oboljelih.
- Trenutno dostupna terapija temelji se na dugodjelujućim agonistima  $\beta_2$  receptora, dugodjelujućim muskarinskim antagonistima i inhalacijskim kortikosteroidima. Usmjerena je na ublažavanje simptoma i smanjenje težine i učestalosti egzacerbacija, a ne na mehanizam nastanka bolesti što ukazuje na potrebu za novim terapijskim pristupima. Temelj dijagnostike čini spirometrija.
- Kao nove potencijalne terapijske mete i biomarkeri KOPB-a istaknule su se male, nekodirajuće miRNA molekule zahvaljujući njihovoj ulozi u regulaciji genske ekspresije te stabilnoj ekspresiji u različitim tjelesnim tekućinama.
- MiRNA ostvaruju svoje učinke inhibicijom translacije ili degradacijom ciljne mRNA molekule na osnovu komplementarnog sparivanja baza.
- Obnova funkcije nedovoljno eksprimiranih miRNA molekula moguća je upotrebom miRNA mimetika, sintetičkih, dvolančanih oligonukleotida, dok se inhibicija prekomjerno eksprimiranih miRNA temelji na primjeni tehnologije koja koristi miRNA spužve koja koristi mRNA molekule s komplementarnim veznim mjestima za ciljne miRNA, odnosno na upotrebi antagomira, jednolančanih antisense oligonukleotida, kemijski modificiranih s ciljem postizanja optimalne stabilnosti, farmakokinetike i afiniteta vezanja.
- Kao novi potencijalni terapeutici, s obzirom na ulogu u upalnim procesima, apoptozi i remodeliranju tkiva, istaknule su se molekule miR-146a, miR-150, miR-145-5p, miR-206, miR-212-5p i let-7c.
- Zahvaljujući njihovoj stabilnosti i visokoj ekspresiji u raznim tjelesnim tekućinama, miRNA molekule mogu se koristiti za dijagnozu, ali i kao odlični prediktori razvoja i progresije bolesti. U tom kontekstu istaknule su se molekule miR-34c-5p, miR-20a, miR-28-3p, miR-100, miR-7, miR-29b, miR-21/miR-181a. U dijagnostici akutnih

egzacerbacija KOPB-a moguća je primjena miR-125b, dok se za stanje preklapanja astme i KOPB-a kao odličan potencijalan biomarker istaknula molekula miR-15b-5p.

- Izvanstanične vezikule posrednici su međustanične komunikacije prijenosom bioloških signala između stanica. Njihova sekrecija i sastav podložni su promjenama pod utjecajem iritansa iz okoliša pridonoseći tako razvoju i progresiji bolesti. Jedna od sastavnica izvanstaničnih vezikula su i miRNA molekule.
- Abnormalna izmjena informacija između bronhijalnih epitelnih stanica i bronhijalnih fibroblasta, posredovana miRNA molekulama transportiranima izvanstaničnim vezikulama, može pridonijeti remodeliranju dišnih puteva diferencijacijom fibroblasta u miofibroblaste. U tom kontekstu, istaknule su se miR-210 i miR-21 molekule.
- Izvanstanične vezikule, odnosno miR-570 i miR-34a molekule u njihovom sastavu, čine sponu između oksidacijskog stresa i ubrzanog staničnog starenja regulacijom razine sirtuina.
- Osim što se mogu koristiti kao potencijalni biomarkeri, izvanstanične vezikule mogući su terapeutici u KOPB-u. Naime, moguće je uklanjanje vezikula koje sadrže miRNA molekule uključene u patogenezu bolesti, no u žarištu interesa nalaze se izvanstanične vezikule derivirane iz mezenhimalnih matičnih stanica kao mogući prijenosnici željenih terapijskih molekula.
- Velik potencijal krije se u miRNA molekulama i njihovoj primjeni kao biomarkerima i terapijskim metama u KOPB-u, no potrebna su daljnja ispitivanja njihove uloge u patogenezi, učinkovitosti i sigurnosti. Izgledno je da su miRNA molekule budućnosti koje će s vremenom stupiti u svakodnevnu kliničku praksu, stoga je njihovo daljnje istraživanje presudno.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

3' UTR - 3' netranslatirana regija (engl. 3' untranslated region)

$\alpha$ -SMA -  $\alpha$ -aktin glatkih mišića (engl.  $\alpha$ -smooth muscle actin)

AAT -  $\alpha$ 1-antitripsin (engl.  $\alpha$ 1-antitrypsin)

AATD - deficijencija  $\alpha$ 1-antitripsina (engl.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency)

ACO - preklapanje astme i KOPB-a (engl. asthma-COPD overlap)

Ago - engl. Argonaute proteins

ARF6 - ADP-ribozilacijski čimbenik 6 (engl. ADP-ribosylation factor 6)

Atg7 - engl. autophagy related protein

BAL - bronhoalveolarni ispirak (engl. bronchoalveolar lavage)

Bax - engl. Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 - engl. B-cell lymphoma 2

BEAS-2B - ljudska bronhijalna epitelna stanična linija

BET - obitelj proteina s bromodomenom i ekstraterminalnom domenom (engl. bromodomain and extraterminal domain protein family)

BRD4 - protein 4 koji sadrži bromodomen (engl. bromodomain protein 4)

CAT - engl. COPD Assessment Test

CCL2 - engl. C-C motif chemokine ligand 2

CCR2 - engl. C-C chemokine receptor type 2

COX-2 - ciklooksigenaza 2 (engl. cyclooxygenase-2)

CRP - C-reaktivni protein (engl. C-reactive protein)

CTGF - čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. connective tissue growth factor)

CXCL - engl. C-X-C motif chemokine ligand

CXCR - engl. C-X-C motif chemokine receptor

DGCR8 - engl. DiGeorge Syndrome Critical Region 8

dsRBD - domena koja veže dvolančanu RNA (engl. double-stranded RNA binding domain)

dsRNA - dvolančana RNA (engl. double-stranded RNA)

eIF - eukariotski inicijacijski čimbenik (engl. eukaryotic initiation factor)

ERK - kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (engl. extracellular signal-regulated kinase)

Exp-5 - eksportin-5 (engl. exportin-5)

FEV<sub>1</sub> - forsirani ekspiratorni volumen u jednoj sekundi (engl. forced expiratory volume in one second)

FoxO3a - engl. Forkhead box O3a

FVC - forsirani vitalni kapacitet (engl. forced vital capacity, FVC)

GDP - gvanozin difosfat

GOLD - Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)

GTP - gvanozin trifosfat

GW4869 - inhibitor neutralne sfingomijelinaze 2

HCV - virus hepatitisa C

HIF-1 $\alpha$  - engl. hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$

hnRNPA2B1 - heterogeni jezgrin ribonukleoprotein A2/B1 (engl. heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1)

ICS - inhalacijski koritkosteroidi (engl. inhaled corticosteroids)

IGFBP3 - protein 3 koji veže čimbenik rasta sličan inzulinu (engl. insulin like growth factor binding protein 3)

IL - interleukin

ILVs - intraluminalne vezikule (engl. intraluminal vesicles)

KLF5 - Kruppel-sličan čimbenik 5 (engl. Kruppel-like factor)

KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest (engl. chronic obstructive pulmonary disease)

LABA - dugodjelujući agonisti  $\beta$ 2 receptora (engl. long-acting  $\beta$ 2-agonists)

LAMA - dugodjelujući muskarinski antagonisti (engl. long-acting muscarinic antagonists)

LTB4 - leukotrien B4

m<sup>7</sup>G - 7-metilgvanozin (engl. 7-methylguanosine)

miRISC - miRNA-inducirani utišavački kompleks (engl. miRNA-induced silencing complex)

miRNA, miR - mikroRNA (engl. microRNA)

MMP - metaloproteinaze matriksa (engl. matrix metalloproteinases)

mMRC - engl. modified British Medical Research Council questionnaire

MSC - mezenhimalne matične stanice (engl. mesenchymal stem cells)

MSC-EV - izvanstanične vezikule porijeklom iz MSC (engl. mesenchymal stem cells extracellular vesicles)

MVBs - multivezikularna tijela (engl. multivesicular bodies)

NF- $\kappa$ B - jezgrin čimbenik- $\kappa$ B (engl. nuclear factor- $\kappa$ B)

NK - stanice prirodne ubojice (engl. natural killer cells)

Notch3 – engl. neurogenic locus notch homolog protein 3

Nrf2 - engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2

p53 - tumor supresor p53

PABP – protein koji veže poli-A (engl. poly-A binding protein)

PACT - aktivator proteinske kinaze R (engl. protein kinase R-activating protein)

PAZ - Piwi/Argonaute/Zwille

PGE2 - prostaglandin E2 (engl. prostaglandine E2)

PLD- fosfolipaza D (engl. phospholipase D)

poli-A-rep - poliadenilatni rep

pre-miRNA - prekursorska miRNA (engl. precursor miRNA)

pri-miRNA - primarna miRNA (engl. primary miRNA)

pVHL - von Hippel-Lindau protein

Ran - engl. RAs-related nuclear protein

Ran-GAP - Ran GTPazni aktivirajući protein (engl. Ran GTPase activating protein)

RISC - RNA-inducirani utišavački kompleks (engl. RNA-induced silencing complex)

RNA pol II - RNA polimeraza II (engl. RNA polymerase II)

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species)

ssRNA - jednolančana RNA (engl. single-stranded RNA)

sTNF $\alpha$ R1 - receptor-1 za topljivi čimbenik nekroze tumora- $\alpha$  (engl. soluble tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor-1)

TGF- $\beta$  - transformirajući čimbenik rasta beta (engl. transforming growth factor beta)

Th17 - T pomagač 17 stanica (engl. T helper 17 cell)

TNF- $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor alpha)

TNFR-II - TNF receptor II

TRBP - TAR RNA vezujući protein (engl. transactivation response RNA binding protein)

VAMP3 - engl. vesicle-associated membrane protein 3

VEGF-A - vaskularni endotelni faktor rasta-A (engl. vascular endothelial growth factor-A)

YKL-40 - protein 1 sličan kitinazi-3 (engl. chitinase-3-like protein 1)

## 7. LITERATURA

Akbas F, Coskunpinar E, Aynaci E, Müsteri Oltulu Y, Yildiz P. Analysis of serum micro-RNAs as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res*, 2012, 38(6), 286-294.

Akers JC, Gonda D, Kim R., Carter BS, Chen, CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*, 2013, 113(1), 1-11.

Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther*, 2017, 174, 63-78.

Barnes PJ. Oxidative stress-based therapeutics in COPD. *Redox Biol*, 2020, 33, 101544.

Barnes PJ. Small airway fibrosis in COPD. *Int J of Biochem Cell Biol*, 2019, 116.

Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin Sci*, 2017, 131(13), 1541-1558.

Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*, 2004, 56(4), 515-548.

Berndt A, Leme AS, Shapiro SD. Emerging genetics of COPD. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(11), 1144-1155.

Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*, 2014, 51(4), 759-774.

Bushati N, Cohen SM. MicroRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23, 175-205.

Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, Proteomics Bioinf*, 2009, 7(4), 147-154.



Caramori G, Casolari P, Barczyk A, Durham AL, di Stefano A, Adcock I. COPD immunopathology. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(4), 497-515.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhan CY. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18(10), 997-1006.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 321.

Correia de Sousa MC, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24), 6249.

Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays in Biochem*, 2013, 54(1), 29-38.

Dang X, Yang L, Guo J, Hu H, Li F, Liu Y, Pang Y. miR-145-5p is associated with smoke-related chronic obstructive pulmonary disease via targeting KLF5. *Chem-Biol Interact*, 2019, 300, 82-90.

de Smet EG, Mestdagh P, Vandesompele J, Brusselle GG, Bracke KR. Non-coding RNAs in the pathogenesis of COPD. *Thorax*, 2015, 70(8), 782-791.

Duffy SP, Criner GJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Evaluation and Management. *Med Clin North Am*, 2019, 103(3), 453-461.

Elias JA, Gustilo K, Baeder W, Freundlich B. Synergistic stimulation of fibroblast prostaglandin production by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Immunol*, 1987, 138(11), 3812-3816.

Essandoh K, Yang L, Wang X, Huang W, Qin D, Hao J, Wang Y, Zingarelli B, Peng T, Fan GC. Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(11), 2362-2371.

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79, 351-379.

Fareh M, Yeom KH, Haagsma AC, Chauhan S, Heo I, Joo C. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun*, 2016, 7, 13694.

Fouka E, Papaioannou AI, Hillas G, Steiropoulos P. Asthma-COPD Overlap Syndrome: Recent Insights and Unanswered Questions. *J Pers Med*, 2022, 12(5), 708.

Fujita Y, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Kosaka N, Yoshioka Y, Kadota T, Hara H, Kuwano K, Ochiya T. Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1), 28388.

Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(1), 21–37.

Genschmer KR, Russell DW, Lal C, Szul T, Bratcher PE, Noerager BD, Abdul Roda M, Xu X, Rezonzew G, Viera L, Dobosh BS, Margaroli C, Abdalla TH, King RW, McNicholas CM, Wells JM, Dransfield MT, Tirouvanziam R, Gaggar A, Blalock JE. Activated PMN Exosomes: Pathogenic Entities Causing Matrix Destruction and Disease in the Lung. *Cell*, 2019, 176(1-2), 113-126.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, <https://goldcopd.org/>, pristupljeno 15.4.2022.

Gomez N, James V, Onion D, Fairclough LC. Extracellular vesicles and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic review. *Respir Res*, 2022, 23(1), 82.

Gon Y, Shimizu T, Mizumura K, Maruoka S, Hikichi M. Molecular techniques for respiratory diseases: MicroRNA and extracellular vesicles. *Respirology*, 2020, 25(2), 149-160.

Hagstad S, Bjerg A, Ekerljung L, Backman H, Lindberg A, Roñmark E, Lundbäck B. Passive smoking exposure is associated with increased risk of COPD in never smokers. *Chest*, 2014, 145(6), 1298-1304.

Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH, Yang WY, Haussler D, Belloch R, Kim VN. Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, 2009, 136(1), 75-84.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, 2004, 18(24), 3016-3027.

Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated Endocytosis of Transferrin and of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes Recycling. *J Cell Biol*, 1983, 97(2), 329-339.

Hauser P, Wang S, Didenko VV. Apoptotic bodies: Selective detection in extracellular vesicles. *Methods Mol Biol*, 2017, 1554,193-200.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmouliere A, Varga J, de Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: Paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol*, 2012, 180(4), 1340-1355.

Hirai K, Shirai T, Shimoshikiryo T, Ueda M, Gon Y, Maruoka S, Itoh K. Circulating microRNA-15b-5p as a biomarker for asthma-COPD overlap. *Allergy*, 2021, 76(3), 766-774.

Hoesterey D, Das N, Janssens W, Buhr RG, Martinez FJ, Cooper CB, Tashkin DP, Barjaktarevic I. Spirometric indices of early airflow impairment in individuals at risk of developing COPD: Spirometry beyond FEV1/FVC. *Respir Med*, 2019, 156, 58-68.

Hough KP, Chanda D, Duncan SR, Thannickal VJ, Deshane JS. Exosomes in immunoregulation of chronic lung diseases. *Allergy*, 2017, 72(4), 534-544.

Hu HL, Nie ZQ, Lu Y, Yang X, Song C, Chen H, Zhu S, Chen BB, Huang J, Geng S, Zhao S. Circulating miR-125b but not miR-125a correlates with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and the expressions of inflammatory cytokines. *Medicine (United States)*, 2017, 96(51), e9059.

Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM, Peters-Golden, M. Prostaglandin E 2 inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292, 405-413.

Ivošević A, Jakopović MM, Stanković M, Prkačin I. MicroRNA in Chronic Kidney Disease and Heart Failure. *Cardiologia Croatica*, 2018, 13(9-10), 270-276.

Jia Q, Chang J, Hong Q, Zhang JJ, Zhou H, Chen FH. MiR-212-5p exerts a protective effect in chronic obstructive pulmonary disease. *Discov Med*, 2018, 26(144), 173-183.

Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*, 2016, 7(11), 1801.

Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(4), 414-421.

Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*, 2019, 167, 12-24.

Kim YS, Lee WH, Choi EJ, Choi JP, Heo YJ, Gho YS, Jee YK, Oh YM, Kim YK. Extracellular Vesicles Derived from Gram-Negative Bacteria, such as Escherichia coli , Induce Emphysema Mainly via IL-17A–Mediated Neutrophilic Inflammation . *J Immunol*, 2015, 194(7), 3361-3368.

Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest*, 2013, 144(1), 266-273.

Lässer C, Eldh M, Lötval J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Visualized Exp*, 2012, 59, 1-6.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CSR, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 2008, 141(5), 672-675.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambrost V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5), 843-854.

Li N, Li S, Wu Y, Xiong L, Li T, Xing D, Li Q, Wu D. Dexmedetomidine targets miR-146a and participates in the progress of chronic obstructive pulmonary disease in vivo and in vitro. *Genes Genomics*, 2021, 43(12), 1371-1379.

Li P, Han J, Zhang D, Cao S, Su C. Effects of dexmedetomidine on oxidative stress and inflammatory response in lungs during mechanical ventilation in COPD rats. *Exp Ther Med*, 2019, 19(2), 1219-1224.

Li Y, Yin Z, Fan J, Zhang S, Yang W. The roles of exosomal mirnas and lncrnas in lung diseases. *Signal Transduc Target Therapy*, 2019, 4(1), 47.

Liao W, Dong J, Peh HY, Tan LH, Lim KS, Li L, Wong WSF. Oligonucleotide therapy for obstructive and restrictive respiratory diseases. *Molecules*, 2017, 22(1), 139.

Lima JF, Cerqueira L, Figueiredo C, Oliveira C, Azevedo NF. Anti-miRNA oligonucleotides: A comprehensive guide for design. *RNA Biol*, 2018, 15(3), 338-352.

Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: Biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol*, 2008, 18(1), 113-121.

Liu B, Li J, Cairns MJ. Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinf*, 2014, 15(1), 1-19.

Ma Y, Liu X, Long Y, Chen Y. Emerging Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Chronic Respiratory Diseases: An Overview of Recent Progress. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10, 845042.

Mackay AJ, Hurst, JR. COPD exacerbations: causes, prevention, and treatment. *Med Clin North America*, 2012, 96(4), 789-809.

Maltby S, Plank M, Tay HL, Collison A, Foster PS. Targeting MicroRNA function in respiratory diseases: Mini-review. *Front Physiol*, 2016, 7, 21.

Mammen JR, Lee JE. Understanding the genetics of chronic obstructive pulmonary disease,  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency, and implications for clinical practice. *J Am Assoc Nurse Pract*, 2021, 33(8), 576-579.

Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet*, 2007, 370(9589), 765-773.

Maremanda KP, Sundar IK, Rahman I. Protective role of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cell-derived exosomes in cigarette smoke-induced mitochondrial dysfunction in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 385, 114788.

Mei D, Tan WSD, Tay Y, Mukhopadhyay A, Wong WSF. Therapeutic RNA Strategies for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2020, 41(7), 475-486.

Michalik M, Wójcik-Pszczola K, Paw M, Wnuk D, Koczurkiewicz P, Sanak M, Pękala E, Madeja Z. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(21), 3943-3961.

Miravittles M, Ribera A. Understanding the impact of symptoms on the burden of COPD. *Respir Res*, 2017, 18(1), 67.

Morrison EE, Bailey MA, Dear JW. Renal extracellular vesicles: from physiology to clinical application. *J Physiol*, 2016, 594(20), 5735-5748.

Munir J, Yoon JK, Ryu S. Therapeutic miRNA-Enriched Extracellular Vesicles: Current Approaches and Future Prospects. *Cells*, 2020, 9(10), 2271.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol*, 2018, 9, 402.

O'Farrell HE, Bowman RV, Fong KM, Yang IA. Plasma extracellular vesicle miRNAs can identify lung cancer, current smoking status, and stable COPD. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11), 5803.

O'Farrell HE, Yang IA. Extracellular vesicles in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Thorac Dis*, 2019, 11, 2141-2154.

Olejniczak M, Kotowska-Zimmer A, Krzyzosiak W. Stress-induced changes in miRNA biogenesis and functioning. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2), 177-191.

Osei ET, Florez-Sampedro L, Timens W, Postma DS, Heijink IH, Brandsma CA. Unravelling the complexity of COPD by microRNAs: It's a small world after all. *Eur Respir J*, 2015, 46(3), 807-818.

Pan BT, Johnstone RM. Fate of the Transferrin Receptor during Maturation of Sheep Reticulocytes In Vitro: Selective Externalization of the Receptor. *Cell*, 1983, 33(3), 967-978.

Pan BT, Johnstone R. Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis. *J Biol Chem*, 1984, 259(15), 9776-9782.

Pavord ID, Jones PW, Burgel PR, Rabe KF. Exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2016, 11, 21-30.

Regan EA, Hokanson JE, Murphy JR, Make B, Lynch DA, Beaty TH, Curran-Everett D, Silverman EK, Crapo JD. Genetic epidemiology of COPD (COPDGene) study design. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2010, 7(1), 32-43.

Reid LV, Spalluto CM, Watson A, Staples KJ, Wilkinson TMA. The Role of Extracellular Vesicles as a Shared Disease Mechanism Contributing to Multimorbidity in Patients With COPD. *Front Immunol*, 2021, 12, 754004.

Roffel MP, Bracke KR, Heijink IH, Maes T. miR-223: A Key Regulator in the Innate Immune Response in Asthma and COPD. *Front Med*, 2020, 7, 196.

Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(10), 505-516.

Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discovery*, 2017, 16(3), 203-221.

Sato T, Liu X, Nelson A, Nakanishi M, Kanaji N, Wang X, Kim M, Li Y, Sun J, Michalski J, Patil A, Basma H, Holz O, Magnussen H, Rennard SI. Reduced miR-146a increases prostaglandin E2 in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(8), 1020-1029.

Sato T, Baskoro H, Rennard SI, Seyama K, Takahashi K. MicroRNAs as Therapeutic Targets In Lung Disease: Prospects and Challenges. *Chronic Obstr Pulm Dis*, 2016, 3(1), 382-388.

Segal LN, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease subpopulations and phenotyping. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6), 1961-1971.

Shen Y, Wang L, Wu Y, Ou Y, Lu H, Yao X. A novel diagnostic signature based on three circulating exosomal mircoRNAs for chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Ther Med*, 2021, 22(1), 717.

Silverman EK, Sandhaus RA. Clinical practice Alpha 1-Antitrypsin Deficiency. *N Engl J Med*, 2009, 360(26), 2749-2757.

Sun Y, An N, Li J, Xia J, Tian Y, Zhao P, Liu X, Huang H, Gao J, Zhang X. miRNA-206 regulates human pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis via targeting in chronic obstructive pulmonary disease. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4), 6223-6236.



Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, Yamada M, Yanai M, Yamaya M, Kurosawa S, Yamauchi M, Kubo H. Annual FEV<sub>1</sub> changes and numbers of circulating endothelial microparticles in patients with COPD: a prospective study. *BMJ Open*, 2014, 4(3), 4571.

Tan DBA, Armitage J, Teo TH, Ong NE, Shin H, Moodley YP. Elevated levels of circulating exosome in COPD patients are associated with systemic inflammation. *Respir Med*, 2017, 132, 261-264.

Tang K, Zhao J, Xie J, Wang J. Decreased miR-29b expression is associated with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316, 621-629.

Theotoki EI, Pantazopoulou VI, Georgiou S, Kakoulidis P, Filippa V, Stravopodis DJ, Anastasiadou E. Dicing the disease with dicer: The implications of dicer ribonuclease in human pathologies. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19), 1-24.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, ... Zuba-Surma EK. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1), 1535750.

Thietart S, Rautou PE. Extracellular vesicles as biomarkers in liver diseases: A clinician's point of view. *J Hepatol*, 2020, 73(6), 1507-1525.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6), 654-659.

Van Pottelberge GR, Mestdagh P, Bracke KR, Thas O, van Durme YMTA, Joos GF, Vandesompele J, Brusselle GG. MicroRNA expression in induced sputum of smokers and

patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(7), 898-906.

Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. *Methods Mol Biol*, 2017, 1509, 1-10.

Vogelmeier CF, Román-Rodríguez M, Singh D, Han MLK, Rodríguez-Roisin R, Ferguson GT. Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations. *Respir Med*, 2020, 166, 105938.

Vrbica Ž, Dugac AV, Grle SP, Glunčić TJ, Jakopović M, Samaržija M, Bival S, Krznarić Ž. Recommendations for prevention and treatment of malnutrition in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Lijec Vjesn*, 2018, 140(7-8), 183-189.

Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803(11), 1231-1243.

Wan ES, Silverman EK. Genetics of COPD and emphysema. *Chest*, 2009, 136(3), 859-866.

Wightman B, Ha L, Ruvkun, G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75(5), 855-862.

Wolf, P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol*, 1967, 13(3), 269-288.

Wu J, Yang J, Cho WC, Zheng Y. Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *J Adv Res*, 2020, 24, 317-324.

Xie L, Wu M, Lin H, Liu C, Yang H, Zhan J, Sun S. An increased ratio of serum miR-21 to miR-181a levels is associated with the early pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease in asymptomatic heavy smokers. *Mol BioSyst*, 2014, 10(5), 1072-1081.

Xu H, Ling M, Xue J, Dai X, Sun Q, Chen C, Liu Y, Zhou L, Liu J, Luo F, Bian Q, Liu Q. Exosomal microRNA-21 derived from bronchial epithelial cells is involved in aberrant

epithelium-fibroblast cross-talk in COPD induced by cigarette smoking. *Theranostics*, 2018, 8(19), 5419-5433.

Xu X, Mann M, Qiao D, Li Y, Zhou J, Brasier AR. Bromodomain Containing Protein 4 (BRD4) Regulates Expression of its Interacting Coactivators in the Innate Response to Respiratory Syncytial Virus. *Front Mol Biosci*, 2021, 8, 728661.

Xue H, Li MX. MicroRNA-150 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation and airway epithelial cell apoptosis through repressing p53: MicroRNA-150 in CS-induced lung inflammation. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(9), 920-928.

Zhu M, Ye M, Wang J, Ye L, Jin M. Construction of potential miRNA-mRNA regulatory network in COPD plasma by bioinformatics analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020, 15, 2135-2145.

## 8. SAŽETAK

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) jedan je od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta širom svijeta. Karakterizirana je ireverzibilnim ograničenjem protoka zraka, upalom i remodeliranjem plućnog tkiva. S obzirom na povećanu izloženost populacije čimbenicima rizika za razvoj KOPB-a, simptome koji narušavaju kvalitetu života i nedostatke trenutnog dijagnostičko-terapijskog pristupa, ova bolest predstavlja rastući javnozdravstveni problem. Napori za pronalaskom novih biomarkera i terapijskih meta u središte pozornosti smjestili su mikroRNA (miRNA, miR), 19-22 nukleotida duge i visokokonzervirane molekule, uključene u širok spektar različitih bioloških procesa poput upale, stanične proliferacije, diferencijacije i smrti. Uloga miRNA u regulaciji genske ekspresije komplementarnim sparivanjem s ciljnom mRNA molekulom te njihova iznimna stabilnost u tjelesnim tekućinama čini ih izuzetno zanimljivim područjem za buduća istraživanja. Štoviše, miRNA molekule mogu biti otpuštene u izvanstanični prostor i transportirane do ciljnih stanica u sklopu vezikula posredujući tako međustaničnu komunikaciju što produbljuje tezu o potencijalnim miRNA biomarkerima i terapeutima u KOPB-u. Ovaj pregledni rad pruža uvid u do danas najbolje opisane miRNA molekule koje su se istaknule kao moguće nove terapijske i dijagnostičke mete u KOPB-u. Također, sažeto prikazuje ulogu izvanstaničnih vezikula u patogenezi KOPB-a i njihovu upotrebu kao mogućih biomarkera, terapeutika i nosača za dostavu miRNA terapijskih molekula.

## **SUMMARY**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. It is characterised by irreversible airflow limitation, inflammation and lung tissue remodeling. Considering the increased exposure of the population to the risk factors for development of COPD, the symptoms that impair the quality of life and the shortcomings of the current diagnostic and therapeutic approach, this disease represents a growing public health problem. Efforts to find new biomarkers and therapeutic targets have placed microRNAs (miRNAs, miRs), 19-22 nucleotide long and highly conserved molecules, involved in wide range of various biological processes such as inflammation, cell proliferation, differentiation and death, into the spotlight. The role of miRNAs in the regulation of gene expression by complementary pairing with the target mRNA molecule, as well as their exceptional stability in body fluids, makes them an extremely interesting field for future research. Moreover, miRNA molecules can be released into the extracellular space and transported to target cells via vesicles thus mediating intercellular communication, which deepens the thesis of potential miRNA biomarkers and therapeutics in COPD. This review provides an insight into miRNA molecules best described to date which have emerged as possible new therapeutics and diagnostic targets in COPD. It also summarizes the role of extracellular vesicles in the pathogenesis of COPD as well as their use as potential biomarkers, therapeutics, and delivery vehicles for miRNA therapeutic molecules.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### MikroRNA KAO POTENCIJALNE TERAPIJSKE METE I BIOMARKERI U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI

Marija Pulić

#### SAŽETAK

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) jedan je od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta širom svijeta. Karakterizirana je ireverzibilnim ograničenjem protoka zraka, upalom i remodeliranjem plućnog tkiva. S obzirom na povećanu izloženost populacije čimbenicima rizika za razvoj KOPB-a, simptome koji narušavaju kvalitetu života i nedostatke trenutnog dijagnostičko-terapijskog pristupa, ova bolest predstavlja rastući javnozdravstveni problem. Napori za pronalaskom novih biomarkera i terapijskih meta u središte pozornosti smjestili su mikroRNA (miRNA, miR), 19-22 nukleotida duge i visokokonzervirane molekule, uključene u širok spektar različitih bioloških procesa poput upale, stanične proliferacije, diferencijacije i smrti. Uloga miRNA u regulaciji genske ekspresije komplementarnim sparivanjem s ciljnom mRNA molekulom te njihova iznimna stabilnost u tjelesnim tekućinama čini ih izuzetno zanimljivim područjem za buduća istraživanja. Štoviše, miRNA molekule mogu biti otpuštene u izvanstanični prostor i transportirane do ciljnih stanica u sklopu vezikula posredujući tako međustaničnu komunikaciju što produbljuje tezu o potencijalnim miRNA biomarkerima i terapeutima u KOPB-u. Ovaj pregledni rad pruža uvid u do danas najbolje opisane miRNA molekule koje su se istaknule kao moguće nove terapijske i dijagnostičke mete u KOPB-u. Također, sažeto prikazuje ulogu izvanstaničnih vezikula u patogenezi KOPB-a i njihovu upotrebu kao mogućih biomarkera, terapeutika i nosača za dostavu miRNA terapijskih molekula.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 4 grafička prikaza i 109 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: biomarkeri, izvanstanične vezikule, KOPB, mikroRNA, terapeutici

Mentor: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Bisera Jurišić Dukovski**, *asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Andrea Hulina Tomašković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **MicroRNA AS POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS AND BIOMARKERS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

**Marija Pulić**

#### **SUMMARY**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. It is characterised by irreversible airflow limitation, inflammation and lung tissue remodeling. Considering the increased exposure of the population to the risk factors for development of COPD, the symptoms that impair the quality of life and the shortcomings of the current diagnostic and therapeutic approach, this disease represents a growing public health problem. Efforts to find new biomarkers and therapeutic targets have placed microRNAs (miRNAs, miRs), 19-22 nucleotide long and highly conserved molecules, involved in wide range of various biological processes such as inflammation, cell proliferation, differentiation and death, into the spotlight. The role of miRNAs in the regulation of gene expression by complementary pairing with the target mRNA molecule, as well as their exceptional stability in body fluids, makes them an extremely interesting field for future research. Moreover, miRNA molecules can be released into the extracellular space and transported to target cells via vesicles thus mediating intercellular communication, which deepens the thesis of potential miRNA biomarkers and therapeutics in COPD. This review provides an insight into miRNA molecules best described to date which have emerged as possible new therapeutics and diagnostic targets in COPD. It also summarizes the role of extracellular vesicles in the pathogenesis of COPD as well as their use as potential biomarkers, therapeutics, and delivery vehicles for miRNA therapeutic molecules.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 4 figures and 109 references. Original is in Croatian language.

Keywords: biomarkers, extracellular vesicles, COPD, microRNA, therapeutics

Mentor: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Bisera Jurišić Dukovski, Ph.D.** *Research Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2022.

