

Višnja Rešić

**Molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva  
kao medijatori upale u kroničnoj opstruktivskoj  
plućnoj bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

*Zahvaljujem svojoj mentorici, doc.dr.sc. Aniti Somborac Bačura na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju te na strpljenju i svim stručnim savjetima bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.*

*Najveću zahvalu za sva moja postignuća dugujem svojim roditeljima Ivi i Ljubici, bratu Marku i baki Stani, koji nikada nisu prestali vjerovati u mene.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima i cimi Maji na najljepšim studentskim danima, kojih ću se sjećati uvijek i s velikom nostalgijom.*

*I na kraju, mojem Ivanu, mojoj najvećoj ljubavi i podršci od prvoga dana, beskrajno hvala. Ovo je i za tebe...*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Kronična opstrukijska plućna bolest (KOPB)</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Definicija.....	1
1.1.2. Epidemiologija .....	1
1.1.3. Etiologija .....	2
1.1.4. Patologija.....	3
1.1.5. Patogeneza.....	3
1.1.6. Klinička slika.....	4
1.1.6.1. Stabilna kronična opstrukijska plućna bolest .....	4
1.1.6.2. Egzacerbacije .....	5
1.1.7. Komorbiditeti .....	6
1.1.8. Dijagnoza .....	6
<b>1.2. Molekularni obrasci povezani s patogenima/oštećenjem tkiva (PAMP / DAMP molekule)</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3. Endogeni molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (endogene DAMP molekule) ili alarmini</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Definicija.....	10
1.3.2. Klasifikacija .....	12
1.3.3. Uloga DAMP molekula u urođenoj imunosti .....	16
1.3.4. Uloga endogenih DAMP molekula u stečenoj imunosti.....	16
<b>1.4. Uloga DAMP molekula u upalnom procesu KOPB-a</b> .....	<b>17</b>
1.4.1. Signalni putovi koje aktiviraju DAMP molekule relevantne kod bolesnika s KOPB-om .....	18
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>21</b>
<b>4. RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1. DAMP molekule citoplazmatskog podrijetla</b> .....	<b>22</b>

4.1.1. Proteini toplinskog šoka (eng. heat shock proteins, HSPs).....	22
4.1.1.1. HSPs u izvanstaničnom prostoru.....	23
4.1.1.2. Utjecaj dima cigarete na vrijednosti HSPs.....	23
4.1.1.3. HSP27.....	24
4.1.1.4. HSP70.....	25
4.1.2. S100 proteini .....	27
4.1.2.1. S100A8.....	28
4.1.2.2. S100A9.....	29
4.1.2.3. S100A8/S100A9 (kalprotektin).....	30
4.1.2.4. S100A4.....	30
4.1.3. Galektini .....	31
4.1.3.1. Galektin-3.....	32
4.1.3.2. Uloga galektina u disfunkciji plućnih makrofaga .....	33
4.1.4. Antimikrobni peptidi.....	34
4.1.4.1. LL-37.....	34
4.1.5. Mokraćna kiselina .....	36
<b>4.2. DAMP molekule podrijetlom iz staničnih organela.....</b>	<b>39</b>
4.2.1. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (eng. high-mobility group box 1, HMGB1) .....	39
<b>4.3. DAMP molekule podrijetlom iz mitohondrija.....</b>	<b>43</b>
4.3.1. Mitohondrijska DNA.....	43
4.3.2. Izvanstanični adenozin-5'-trifosfat (eATP) .....	44
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>48</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>50</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>62</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>63</b>
<b>8. PRILOZI.....</b>	<b>64</b>
<b>8.1. Popis kratica .....</b>	<b>64</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB)

### 1.1.1. Definicija

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) progresivna je bolest koju karakteriziraju postojani respiratorni simptomi i ograničavanje protoka zraka nastali zbog abnormalnosti na razini dišnih putova i / ili alveola obično uzrokovanih značajnom izloženošću štetnim česticama ili plinovima. Posljedica toga je kronična upala koja uzrokuje strukturne promjene, sužavanje malih dišnih putova i razaranje plućnog parenhima što dovodi do propadanja stijenki alveola (vezivnog tkiva) na malim dišnim putovima i smanjenja plućnog elasticiteta. Zbog svega navedenog, smanjuje se sposobnost dišnih putova da ostanu otvoreni tijekom izdisaja. Mnoge prethodne definicije KOPB-a isticale su pojmove emfizema i kroničnog bronhitisa, koji nisu uključeni u definiciju korištenu u ovom ili ranijim izvještajima Globalne inicijative za kroničnu opstruktivsku plućnu bolest (eng. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, GOLD). Pojam emfizema ili destrukcije stijenke alveola, često i pogrešno se koristi u kliničkoj praksi, jer opisuje samo jednu od nekoliko strukturnih abnormalnosti prisutnih u bolesnika s KOPB-om. Kronični bronhitis, zvan i sindrom kronične mukozne hipersekrecije, definira se kao kronična upala dišnih putova koja uzrokuje pojačanu sekreciju sluzi što se očituje produktivnim kašljem u trajanju minimalno 3 mjeseca u godini, 2 uzastopne godine, kojem je isključena svaka druga etiologija. On je neovisan klinički entitet i može biti povezan s poticanjem ili ubrzanjem trajne bronhoopstrukcije, ali može postojati i kod osoba s normalnom spirometrijom (GOLD 2020).

### 1.1.2. Epidemiologija

Prema nekim studijama, prevalencija KOPB-a znatno je veća kod pušača, osoba starijih od 40 godina i kod muškaraca. Međutim, noviji podaci iz razvijenih zemalja pokazuju da je prevalencija KOPB-a sada gotovo jednaka kod muškaraca i žena, što vjerojatno odražava promjene obrazaca pušenja duhana. 3,2 milijuna ljudi u svijetu umrlo je od KOPB-a u 2015. godini, što predstavlja 5 % svih smrtnih slučajeva na globalnoj razini u toj godini (<https://www.who.int/news-room/fact->

[sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](#)). Globalno se očekuje da će se problem KOPB-a povećati u narednim desetljećima zbog kontinuirane izloženosti čimbenicima rizika kao i starenja svjetskog stanovništva; kako se životni vijek povećava, i više ljudi će izražavati dugoročne učinke izloženosti čimbenicima rizika za razvoj ove bolesti. Konkretno to znači da se do 2060. godine očekuje porast prevalencije KOPB-a na preko 5,4 milijuna smrtnih slučajeva godišnje (GOLD 2020).

### 1.1.3. Etiologija

U cijelome svijetu pušenje cigareta je najčešći okolišni čimbenik rizika za razvoj KOPB-a. Pušači imaju veću prevalenciju respiratornih simptoma i abnormalnosti plućne funkcije, veću godišnju stopu pada forsiranog izdisajnog volumena u prvoj sekundi (FEV<sub>1</sub>) i veću stopu smrtnosti od KOPB-a u usporedbi s nepušačima. Ostale vrste duhana (npr. lula, cigara, vodena lula) i marihuana također su čimbenici rizika za KOPB. No, čak i kod teških pušača, manje od 50 % oboli od KOPB-a tijekom svog života. Pasivna izloženost dimu cigareta, odnosno duhanskom dimu iz okoliša, također može pridonijeti respiratornim simptomima i KOPB-u povećavanjem ukupne izloženosti pluća na udahnute čestice i plinove. Genetski čimbenik rizika koji je najbolje dokumentiran je nasljedni nedostatak  $\alpha$ -1-antitripsina, glavnog inhibitora serinskih proteaza. Starosna dob često se navodi kao čimbenik rizika za KOPB. Još uvijek je nejasno predisponira li zdravo starenje kao takvo razvoju KOPB-a ili starosna dob odražava zbroj kumulativnih izloženosti tijekom života (GOLD 2020). Starenje dišnih putova i parenhima pokazuju neke strukturne promjene prisutne i kod KOPB-a; starenje pluća karakterizira gubitak elastičnosti, povećanje alveola, slaba upala, ali za razliku od KOPB-a, bez djelovanja na alveolarne stijenke (Mercado i sur., 2015).

Također, danas se procjenjuje da se 15 % svih slučajeva KOPB-a može pripisati profesionalnoj izloženosti, uključujući organskoj i anorganskoj prašini, kemijskim sredstvima, plinovima i parama. Gorivo čiji je izvor biomasa također je jedan od čimbenika rizika. Gotovo tri milijarde ljudi širom svijeta koristi biomasu i ugljen kao glavni izvor energije za kuhanje, grijanje i ostale potrebe kućanstva, pa je populacija u riziku širom svijeta vrlo velika. Takvi izvori emitiraju visoku razinu mnogih onečišćujućih tvari, od kojih je većina u rasponu veličina koje se mogu udisati (< 10  $\mu$ m) i sličnih onima prisutnim u duhanskom dimu (Pirozzi i Scholand, 2012).

Astma, kronični bronhitis i infekcije također se navode među rizičnim čimbenicima. Povijest ozbiljnih respiratornih infekcija u dječjoj dobi ima utjecaj na smanjenje plućne funkcije i pojavu respiratornih simptoma u odrasloj dobi (GOLD 2020).

#### 1.1.4. Patologija

Progresivno ograničenje protoka zraka kod KOPB-a uzrokovano je dvama glavnim patološkim procesima: preoblikovanjem i sužavanjem malih dišnih putova i destrukcijom plućnog parenhima s posljedičnim uništavanjem vezivnog tkiva alveolarnih stijenki. Te patološke promjene također zahvaćaju i vaskulaturu, a rezultat su kronične upale, s povećanim brojem specifičnih tipova imunskih stanica u različitim dijelovima pluća, zbog čega dolazi do opetovanih ozljeda tkiva i njegovog popravka. Opstrukcija malih dišnih putova i gubitak alveolarnog vezivnog tkiva rezultiraju zatvaranjem dišnih putova, zarobljavanjem zraka i hiperinflacijom pluća (Barnes, 2014). Općenito, takve promjene rastu s težinom bolesti, ali ostaju perzistentnima nakon prestanka pušenja (GOLD 2020).

#### 1.1.5. Patogeneza

KOPB uključuje kronične upalne procese u plućima, perifernim dišnim putovima i parenhimu koji se povećavaju tijekom akutnih egzacerbacija. Upalni odgovor u plućima bolesnika s KOPB-om uključuje i urođenu imunost (neutrofil, makrofagi, eozinofili, mastociti, stanice prirodne ubojice,  $\gamma\delta$  T stanice i dendritičke stanice) i stečenu imunost (T i B limfociti), ali i aktiviranje strukturnih stanica (stanice alveolarnog epitela, endotelne stanice i fibroblasti). Dim cigarete i drugi iritansi koji se udišu, u dišnim putovima mogu aktivirati površinske makrofage i epitelne stanice koje potom oslobađaju različite medijatore upale (čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL) 1- $\beta$ , IL-6, granulocitno-makrofagni čimbenik koji stimulira koloniju (GM-CSF)) te kemotaktičke tvari, posebno kemokine (CXCL8 (IL-8)), koji privlače cirkulirajuće neutrofile, monocite i limfocite u pluća. Epitelne stanice u malim dišnim putovima također mogu biti važan izvor transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (eng. transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) koji tada izaziva lokalnu fibrozu. Moguće je da memorijske T stanice, kolonizacija bakterija ili autoimunost potiču trajnu upalu u bolesnika s KOPB-om (Barnes, 2014). Alveolarni makrofagi bolesnika s KOPB-om luče više upalnih proteina i imaju veću elastolitičku aktivnost

nego kod normalnih pušača, a to se dodatno povećava izlaganjem cigaretnom dimu. Makrofagi bolesnika s KOPB-om također su oštećeni u fagocitiranju apoptotskih stanica.

Pušenje ima izravan stimulativni učinak na proizvodnju granulocita i oslobađanje iz koštane srži, moguće posredovano GM-CSF-om i čimbenikom stimulacije kolonije granulocita (G-CSF) koji se oslobađa iz makrofaga pluća. Neutrofili bolesnika s KOPB-om pokazuju izrazite abnormalnosti u kemotaktičkom odgovoru, s povećanom migracijom, ali smanjenom preciznošću, podsjećajući na nenormalne monocitne kemotaktičke odgovore.

Nadalje, jedina značajna razlika u infiltraciji upalnim stanicama kod asimptomatskih pušača i pušača s KOPB-om je porast T-stanica, uglavnom CD8<sup>+</sup> u bolesnika s KOPB-om. CD8<sup>+</sup> stanice uzrokuju citolizu i apoptozu alveolarnih epitelnih stanica oslobađanjem perforina, granzima B i TNF- $\alpha$  (Barnes, 2014).

Kod bolesnika s KOPB-om postoje dokazi o oksidacijskom i karbonilnom stresu, osobito tijekom akutnih pogoršanja. Alveolarni makrofagi te aktivirani neutrofili bolesnika s KOPB-om su aktivniji i oslobađaju povećane količine reaktivnih kisikovih spojeva (eng. reactive oxygen species, ROS) pa se tako nekoliko biomarkera oksidacijskog stresa nalaze povišenima u kondenzatu izdahnutog zraka (vodikov peroksid, ugljični monoksid, mijeloperoksidaza (MPO) te biljezi oksidacijskog oštećenja tkiva, poput 8-izoprostana, ili biljezi karbonilnog oštećenja tkiva, poput malondialdehida). Nasuprot tome, koncentracije endogenog antioksidansa glutaciona niže su u bronhoalveolarnom ispirku (eng. bronchoalveolar lavage, BAL) kod pacijenata s KOPB-om s čestim egzacerbacijama u usporedbi s onima sa stabilnim KOPB-om (Kirkham i Barnes, 2013).

#### 1.1.6. Klinička slika

##### 1.1.6.1. Stabilna kronična opstruktivska plućna bolest

Kronična i progresivna dispneja najkarakterističniji je simptom KOPB-a. Kašalj sa stvaranjem ispljuvka prisutan je u oko 30 % bolesnika. Ovi simptomi mogu puno godina prije prethoditi razvoju same bolesti. Značajno ograničenje protoka zraka može biti prisutno i bez kronične dispneje i / ili stvaranja kašlja i sputuma te obrnuto. Iako se KOPB definira na temelju stupnja bronhoopstrukcije, u praksi se odluka o traženju medicinske pomoći obično određuje utjecajem simptoma na funkcionalni status bolesnika. Kronični kašalj često je prvi simptom KOPB-a, ali



bolesnik ga obično zanemaruje zbog toga što ga smatra i podrazumijeva posljedicom pušenja i / ili izloženosti okolišu. U početku kašalj može biti povremen, ali kasnije može biti prisutan svaki dan, učestalo tijekom dana. Bolesnici s KOPB-om često iskašljavaju sputum koji je sluzav, a postaje gnojan tijekom pogoršanja.. Umor, gubitak težine i anoreksija česti su problemi u bolesnika s ozbiljnom i vrlo teškom slikom KOPB-a koji imaju prognostičku važnost, a mogu biti i znak drugih bolesti, poput tuberkuloze ili karcinoma pluća (GOLD 2020).

Primijećeno je da bolesnici s KOPB-om imaju lošije psihološko stanje od bolesnika s drugim kroničnim medicinskim stanjima, te da nedostatak znanja o mentalnom zdravlju među zdravstvenim radnicima može predstavljati prepreku dijagnozi i pristupu odgovarajućim intervencijama liječenja. Anksioznost i depresija samo su neki od komorbiditeta u bolesnika s KOPB-om (Miravittles i Ribera, 2017).

#### 1.1.6.2. Egzacerbacije

Pogoršanje KOPB-a može biti povezano s respiratornim (npr. dispneja i producirajući kašalj) i nerrespiratornim simptomima (npr. umor i malaksalost). Konsenzusna definicija egzacerbacije je kontinuirano pogoršanje bolesnikova stanja iz stabilnog stanja i uobičajenih svakodnevnih varijacija, koje je akutno i zahtijeva promjenu terapije ili hospitalizaciju. Ovo su složeni događaji koji su obično povezani s povećanom upalom dišnih putova, povećanom proizvodnjom sluzi i izrazitim zastojem plinova u plućima. Te promjene pridonose povećanoj dispneji koja je najizrazitiji simptom pogoršanja. Ostali simptomi uključuju povećano iskašljavanje i volumen ispljuvka, zajedno s pojačanim kašljem. Pogoršanja KOPB-a imaju kumulativni učinak na plućnu funkciju i često dovode do povećanog korištenja resursa zdravstvene skrbi. Primjerice, blaga pogoršanja često se može liječiti i bez hospitalizacije, ali mogu zahtijevati povećanu upotrebu lijekova za ublažavanje simptoma, poput inhalacijskih bronhodilatatora, dok umjerenim pogoršanjima treba liječenje antibioticima i / ili kortikosteroidima. Teška pogoršanja zahtijevaju hospitalizaciju za napredno praćenje i potencijalne tretmane, uključujući potpomognutu ventilaciju. U često slučajeva egzacerbacije ostaju neprijavljene i neliječene, a one također imaju značajan utjecaj na zdravstveno stanje bolesnika (Pavord i sur., 2016).

### 1.1.7. Komorbiditeti

KOPB je danas prepoznata kao složena bolest koja često koegzistira s drugim stanjima. U opservacijskoj studiji Vanfleteren i suradnika (2013), na 213 bolesnika s KOPB-om zabilježeno je da gotovo svi sudionici (97,7 %) imaju jednu ili više komorbidnih bolesti, a gotovo 54 % ima najmanje četiri. Pretpostavlja se da je sistemska upala poveznica zbog svoje uloge u patogenezi kako KOPB-a tako i popratnih bolesti. Tako bolesnici s KOPB-om koji imaju neki od komorbiditeta izražavaju visoke razine cirkulirajućih biomarkera C-reaktivnog proteina (CRP-a), fibrinogena, IL-6, leukocita i TNF- $\alpha$  tijekom stabilnih uvjeta, što ukazuje na postojanje trajne sistemske upale. Najčešći komorbiditeti koji prate KOPB uključuju kardiovaskularne bolesti, metaboličke poremećaje, osteoporozu, disfunkciju koštanih mišića, anksioznost / depresiju, kognitivna oštećenja, gastrointestinalne bolesti te respiratorna stanja poput astme, bronhiektazije, plućne fibroze i raka pluća. Bolesnici koji uz KOPB imaju i navedena stanja, imaju lošiju kvalitetu života i plućnu funkciju te imaju povećan rizik od hospitalizacije i smrtnog ishoda, zbog čega predstavljaju ekonomsko opterećenje za zdravstveni sustav. Komorbiditeti danas predstavljaju izazov u procjeni i učinkovitom praćenju KOPB-a. Primjerice, stanja poput pretilosti mogu onemogućiti pravilno postavljanje dijagnoze KOPB-a sprečavanjem točne procjene stupnja bronhoopstrukcije i hiperinflacije, koje su definirajuće karakteristike KOPB-a (Negewo i sur., 2015).

### 1.1.8. Dijagnoza

KOPB se najčešće dijagnosticira u relativno kasnom stadiju bolesti, najvjerojatnije zato što se bolesnici adaptiraju na stanje oslabljene plućne funkcije i ostaju neprepoznati, odnosno većina bolesnika dijagnosticira se tijekom pregleda u hitnoj ambulanti ili tijekom bolničkoga liječenja zbog egzacerbacije KOPB-a. Dijagnoza KOPB-a postavlja se na temelju detaljne anamneze, fizikalnog pregleda i nalaza testova plućne funkcije. Ispitivanje plućne funkcije je reproducibilan i objektivnan način procjene funkcije dišnog sustava. Testovi plućne funkcije su ventilacijski (spirometrija, krivulja protok-volumen, tjelesna pletizmografija te farmakodinamički testovi), difuzijski (difuzijski kapacitet pluća za ugljikov monoksid) te plinska analiza arterijske krvi i acidobazni status. Spirometrija je „zlatni standard“ dijagnoze i procjene KOPB-a. Ova pretraga omogućuje mjerenje statičkih i dinamičkih plućnih volumena i kapaciteta te protoka zraka u dišnim

putevima, pri čemu se određuju sljedeći parametri: forsirani izdisajni volumeni u prvoj sekundi ( $FEV_1$ ), forsirani vitalni kapacitet (FVC) te  $FEV_1/FVC$  (u).  $FEV_1$  je volumen zraka koji se najvećom mogućom brzinom izdahne tijekom prve sekunde iz maksimalnog inspiratornog položaja, a snižen je u bronhoopstrukcijskim bolestima (astma, KOPB) i bolestima sa smanjenom elastičnošću pluća (emfizem). FVC (forsirani vitalni kapacitet) je volumen zraka koji se izdahne prilikom forsiranoga, brzog izdaha, a nakon maksimalnog udaha. Smanjenje FVC-a karakteristično je za opstrukcijske bolesti. Dobiveni rezultati uspoređuju se s referentnim vrijednostima koje ovise o dobi, spolu, visini i tjelesnoj masi (Vukić Dugac i Samaržija, 2014).

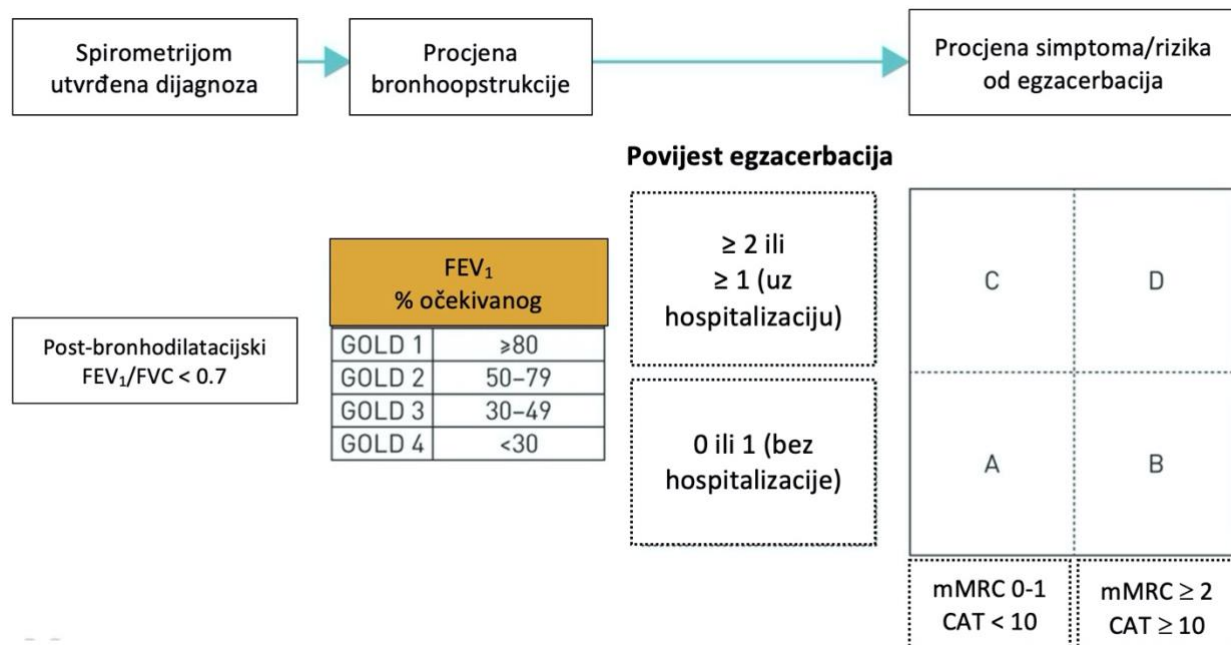
KOPB karakteriziraju smanjene vrijednosti  $FEV_1$  i FVC-a, a nalaz postbronhodilatacijskog  $FEV_1 < 80\%$  i  $FEV_1/FVC < 70\%$  potvrđuje postojanje opstrukcije dišnih puteva koja nije u potpunosti reverzibilna. Na temelju rezultata spirometrije i stupnja bronhoopstrukcije ( $FEV_1$ ), prema smjernicama Globalne inicijative za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (GOLD), bolesnike se može svrstati u jednu od četiri grupe: GOLD 1, GOLD 2, GOLD 3, GOLD 4 (**Tablica 1**) (GOLD 2020).

**Tablica 1.** Procjena stupnja bronhoopstrukcije prema izvještaju GOLD-a iz 2020. godine (GOLD 2020).

STUPANJ	Postbronhodilatacijski $FEV_1$
Bolesnici koji imaju $FEV_1/FVC < 0.70$ :	
GOLD 1: blaga	$FEV_1 \geq 80\%$ od očekivanog
GOLD 2: umjerena	$50\% \leq FEV_1 < 80\%$ od očekivanog
GOLD 3: teška	$30\% \leq FEV_1 < 50\%$ od očekivanog
GOLD 4: vrlo teška	$FEV_1 < 30\%$ od očekivanog

Iako je  $FEV_1$  (stupanj bronhoopstrukcije) vrlo bitan parametar na populacijskoj razini za predviđanje smrtnosti i hospitalizacija, na razini pojedinog pacijenta  $FEV_1$  gubi preciznost. Kako bi se olakšala procjena težine bolesti napravljena je ABCD klasifikacija bolesnika s KOPB-om (eng. *ABCD Assessment Tool*) koja objedinjuje parametre koji se promatraju za procjenu težine bolesti te tako dijele oboljele od kronične opstruktivne bolesti u četiri kategorije – A, B, C i D. ABCD grupe su prema modificiranim GOLD smjernicama rađene uzimajući u obzir bolesnikove

simptome i njihovu povijest egzacerbacija (**Slika 1**). Što se tiče procjene simptoma, neki od upitnika koji se koriste za tu svrhu su mMRC (eng. *Modified British Medical Research Council Questionnaire*) i CAT upitnik (eng. *COPD Assessment Test*). Granična vrijednost CAT upitnika je 10, tako da  $CAT < 10$  označava manje simptoma, a  $CAT \geq 10$  više. Jednako tako, mMRC = 0-1 predstavlja blažu dispneju, dok je mMRC  $\geq 2$  pokazatelj teže dispneje. Odsutnost ili samo jedna egzacerbacija predstavljaju nizak rizik, a dvije ili više njih visok, dok već i jedna hospitalizacija kao posljedica egzacerbacije upućuje na visok rizik (GOLD 2020).



**Slika 1.** Unaprijeđeni alat za procjenu ABCD skupina (preuzeto iz GOLD 2020).

Za diferencijalnu dijagnozu, ali i u procjeni prognoze bolesti i odabiru terapije koristi se bronhodilatacijski test reverzibilnosti opstrukcije koji je najvažniji za razlikovanje astme od KOPB-a, a koji će u bolesnika s astmom biti pozitivan.

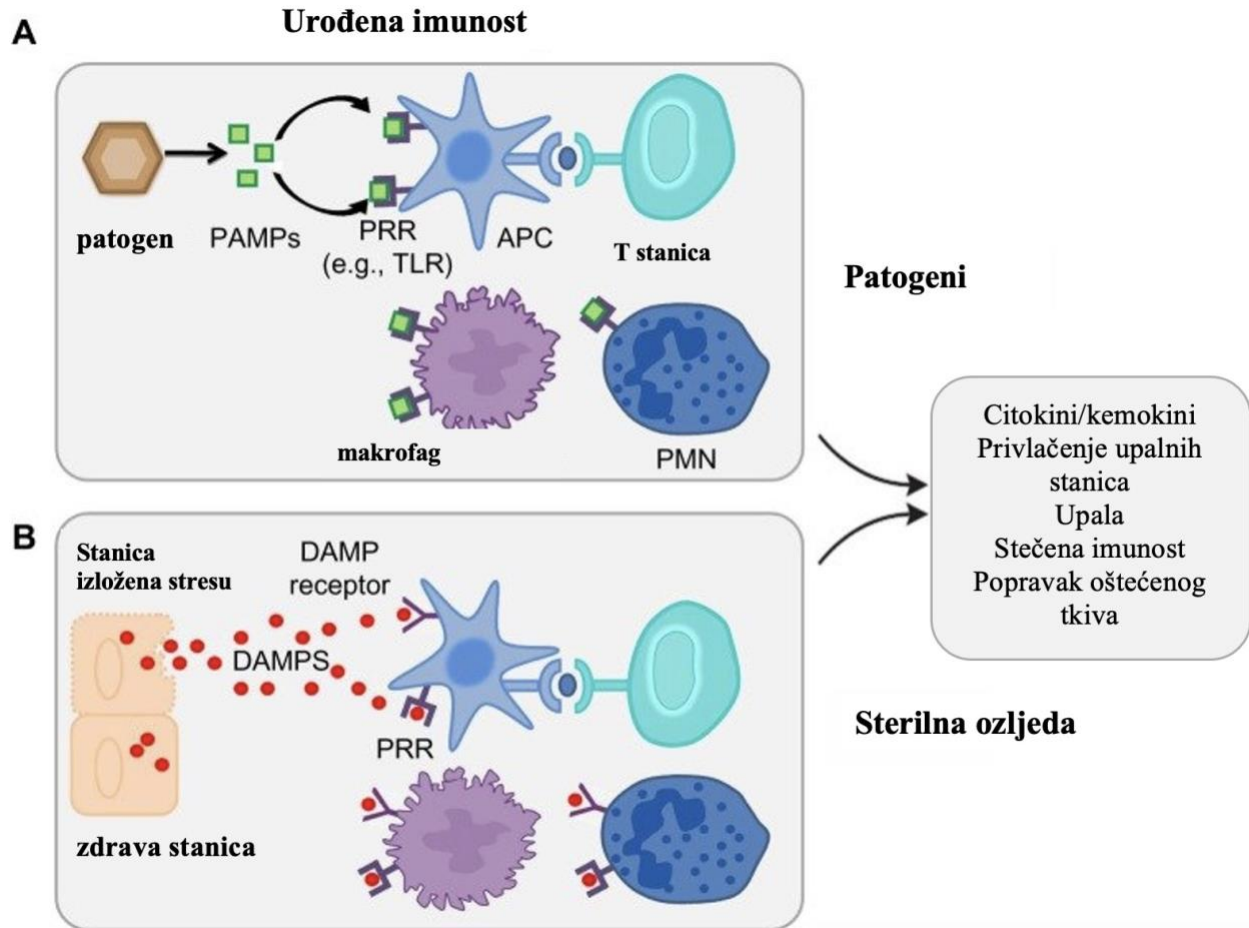
Uz navedene pretrage korisno je učiniti i slikovne pretrage (CT, RTG) koje nemaju kliničkog značaja u vidu rane dijagnostike, ali su nužne u diferencijano-dijagnostičkom postupku. Razina alfa-1-antitripsina određuje se u bolesnika koji su razvili KOPB prije 45. godine života (Vukić Dugac i Samaržija, 2014).

## 1.2. Molekularni obrasci povezani s patogenima/oštećenjem tkiva (PAMP / DAMP molekule)

Cjelovit sustav za otkrivanje, zaustavljanje i popravak oštećenja nanesenih stanicama u organizmu zahtijeva upozoravajuće signalne molekule te stanice koje će na njih reagirati putem receptora i signalnih putova, što se manifestira u obliku fizioloških odgovora. Jedan podtip takvih signala zajednički se naziva molekularnim obrascima povezanim s patogenima (eng. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Oni čine raznolik skup mikrobnih molekula koje dijele niz različitih prepoznatljivih biokemijskih značajki (cijele molekule ili češće dio molekule), koji upozoravaju organizam na prodor patogena. Takve egzogene PAMP molekule prepoznaju stanice urođenog i stečenog imunskog sustava putem receptora za prepoznavanje uzoraka (eng. pattern recognition receptors, PRRs), koji aktiviraju nekoliko signalnih putova (**Slika 2A**) (Bianchi, 2007).

Međutim, patogeni nisu jedini uzročnici oštećenja tkiva i stanica. U sterilnim uvjetima snažni imunski odgovor izazivaju ishemijske ozljede, traume (tkiva se mogu oštetiti mehaničkim silama, prekomjernom toplinom (opekline), hladnoćom, kemijskim agensima (jake kiseline ili baze ili veći broj različitih citotoksičnih otrova)) zračenje, tumori, transplantacija tkiva i autoimune bolesti. Upalni odgovor kod sterilne ozljede pokreće se istim urođenim mehanizmima za prepoznavanje uzoraka koji se koriste i za prepoznavanje mikroorganizama. Međutim, imunostimulacijski molekularni obrasci u sterilnoj upali razlikuju se od mikrobnih uzoraka i u osnovi su povezani s oštećenjem; stoga se nazivaju molekularnim obrascima povezanim s oštećenjem tkiva (eng. damage-associated molecular patterns, DAMPs). DAMP molekule se oslobađaju tijekom oštećenja tkiva i iniciraju upalni odgovor (**Slika 2B**) (Zindel i Kubes, 2020).

Godine 1994. Polly Matzinger je predložila „teoriju opasnosti“ u kojoj je pretpostavljeno da ozlijeđena tkiva oslobađaju unutarstanične molekule koje aktiviraju imunski sustav. Međutim, dugi niz godina "teorija opasnosti" zasnivala se samo na teorijskom modelu, sve dok nisu identificirani prvi endogeni molekularni obrasci povezani s oštećenjem, kao što su npr. HMGB1 (eng. high mobility group box 1) protein i kristali mokraćne kiseline (Vénéreau i sur., 2015).



**Slika 2.** Način na koji patogeni mikroorganizmi (A) i sterilna ozljeda (B) pokreću urođeni imunوسيni odgovor (preuzeto iz Rosin i Okusa, 2011).

### 1.3. Endogeni molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (endogene DAMP molekule) ili alarmini

#### 1.3.1. Definicija

Alarmini su endogene, konstitutivno izražene molekule koje potiču imunost, a oslobađaju se kao rezultat degranulacije, ozljede / smrti stanice. Alarmini funkcioniraju kao međustanični obrambeni signali interakcijom s PRR receptorima i na taj način potiču imunosne stanice (Yang i sur., 2017).

Ove molekule imaju svoju fiziološku ulogu unutar stanice te ulogu signaliziranja oštećenja stanica kada su izvan nje. One su imunom sustavu nevidljive kada su unutar stanice; postaju vidljive tek kada su otpuštene u izvanstanični okoliš (Vénéreau i sur., 2015).

Otpuštanje u izvanstaničnu okolinu događa se poglavito kada stanica podliježe nekrozi, neprogramiranoj staničnoj smrti. Doista, nekrotične stanice su imunostimulirajuće i dovode do infiltracije upalnih stanica i proizvodnje citokina. Nekrotična stanična smrt uključuje stanično otjecanje i bubrenje organela (onkoza), i što je najvažnije, puknuće plazmatske membrane, a to rezultira oslobađanjem unutarstaničnih molekula koje mogu izazvati upalni odgovor. Stvaranje ROS-a, destabilizacija lizosomske membrane, aktivacija proteaza i promjene ionskog toka povezani su s nekrozom i mogu aktivirati sterilne upalne putove uz oslobađanje DAMP molekula. Iako tipično nije povezana s imunogenošću i upalom, apoptoza može postati upalna u uvjetima u kojima dolazi do odgođenog čišćenja i uklanjanja apoptotskih stanica, što se može dogoditi u slučaju prekomjerne apoptoze. Takvi događaji rezultiraju sekundarnom nekrozom s gubitkom integriteta plazmatske membrane te posljedično otpuštanjem endogenih DAMP molekula (Chen i Nuñez, 2010).

Međutim, DAMP molekule ne potječu nužno iz mrtvih stanica. Imunosne stanice također mogu biti potaknute na proizvodnju i lučenje alarmina bez umiranja, pomoću specijaliziranih sustava za izlučivanje ili sekrecijom putem endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgija. Ove molekule privlače i aktiviraju stanice urođenog imunostnog sustava koje izražavaju receptore na svojoj staničnoj površini, uključujući i dendritične stanice, te na taj način izravno ili neizravno potiču i razvoj stečenog imunostnog odgovora. Naposljetku, alarmini također sudjeluju u ponovnoj uspostavi homeostaze, potičući rekonstrukciju tkiva koje je uništeno bilo zbog izravne ozljede ili zbog sekundarnih učinaka upale (Bianchi, 2007).

Osim u razvoju upalnog odgovora, DAMP molekule sudjeluju i u regulaciji ekspresije gena i stanične homeostaze, alergijama, autoimunosti i onkogenezi (Yang i sur., 2017).

Ključna je značajka DAMP molekula da one specifično vežu PRR receptore, koji se eksprimiraju ne samo na makrofagima i dendritičnim stanicama, već i na drugim „neprofesionalnim“ imunostnim stanicama (epitelnim i endotelnim stanicama te fibroblastima) (Takeuchi i Akira, 2010). Postoji nekoliko obitelji PRR receptora: receptori slični Toll-u (eng. Toll-like receptors, TLRs), lektinski receptori tipa C (eng. C-type lectin receptors, CLRs), receptori slični NOD-u (eng. NOD-like

receptors, NLRs), receptori slični RIG-u (eng. RIG-I-like receptors, RLRs) te receptori za krajnje produkte uznapredovale glikacije (eng. receptor for advanced glycation end products, RAGE), koji svi nakon vezanja određene DAMP molekule aktiviraju upalne signalne puteve. To uključuje nuklearni čimbenik  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mitogenima aktivirane proteinske kinaze (MAPK) i putove interferona tipa 1, koji započinju oslobađanje proupalnih citokina i kemokina (npr. IL-6, IL-8, interferon tipa 1 i čimbenik tumorske nekroze), što rezultira aktivacijom imunskog sustava i privlačenjem imunskih stanica na mjesto oštećenja. Glavne funkcije PRR receptora na taj način su poticanje fagocitoze i posredovanje u upali prepoznavanjem različitih patogena i molekula iz oštećenih stanica (Roh i Sohn, 2018).

### 1.3.2. Klasifikacija

DAMP molekule mogu se klasificirati prema svom unutarstaničnom podrijetlu, pa tako mogu potjecati iz citoplazme, jezgre, mitohondrija ili endoplazmatskog retikuluma (**Tablica 2**) (Vénéreau i sur., 2015).

Ovdje pripadaju mokraćna kiselina, kreatinin, feritin, mitohondrijska DNA (mtDNA), izvanstanični adenzin-5'-trifosfat (ATP), proteini toplinskog šoka (eng. heat shock proteins, HSPs), amiloid  $\beta$ , S100 proteini, F-aktin, ciklofilin-A, kromogranin A, histoni, oksidirani fosfolipidi i oksidirani kolesteril esteri, HMGB1 i HMGN1 proteini, IL-1 $\alpha$ , IL-33, SAP130 (podjedinica kompleksa histon deacetilaze), DNA, RNA, mitohondrijski transkripcijski čimbenik A (eng. mitochondrial transcription factor A, TFAM), formil peptid, mitohondrijski reaktivni kisikovi spojevi, defenzini, katelicidin (LL-37), neurotoksin podrijetlom iz eozinofila (eng. eosinophil derived neurotoxin, EDN), granulizin, sindekan, glipikan.

Međutim, DAMP molekule mogu biti i proteini izvanstaničnog matriksa (elastin, fibronektin, laminin, kolagen, fibrinogen, čimbenici rasta podrijetlom iz trombocita (eng. platelet derived growth factor, PDGF), protein induciran transformirajućim čimbenikom rasta beta (eng. transforming growth factor-beta-induced protein, TGFBIp)), proteoglikani (biglikan, dekorin, heparan sulfat, perlekan, verzikan, hijaluronan niske molekulske mase), glikoproteini, peptidi (angiotenzin), hormoni i izvanstanična RNA (Patel, 2018; Roh i Sohn, 2018).



Premda, do danas nije dostupan standardni sustav klasifikacije DAMP molekula, jedna je publikacija predložila podjelu heterogene skupine DAMP molekula u pet klasa na temelju prepoznavanja nekog od receptora iz pet obitelji PRR receptora (TLRs, RAGE, NLRs, RLRs, receptori slični AIM2 (eng. absent in melanoma (AIM) 2-like receptors, ARLs)) (Heil i Land, 2014): klasa 1 (kromatin, HMGB1, HSPs), klasa 2 (ROS, mononatrijev urat, izvanstanični ATP, genomska DNA), klasa 3 (stresom inducirani topljivi lanci A/B glavnog kompleksa histokompatibilnosti, MIC-A, MIC-B), klasa 4 (neoantigeni poput ne mišićnog miozina II (), aktinski citoskelet i oksidirani fosfolipidi) i klasa 5 (molekularni obrasci povezani s promjenama u homeostazi koji odražavaju poremećaje stabilnog stanja: hipoksiju, promjene kiselosti ili osmolarnosti, metabolički stres kao što je stres endoplazmatskog retikuluma) (Heil i Land, 2014).

**Tablica 2.** Popis poznatih DAMP molekula i njihova uloga u upali i popravku tkiva (Vénéreau i sur., 2015).

Stanični odjeljak	DAMP molekula	Receptor	Stanično otpuštanje	Uloga u upali/imunosnom odgovoru	Uloga u regeneraciji tkiva
<b>Jezgra</b>	Histoni	TLR2, TLR4, TLR9	P, S i A	Upalni odgovor ovisan o TLR-u i inflamasomu	Nije opisana
	Genomska DNA	TLR9	P	Urođen odgovor posredovan s TLR9 i NALP3, sazrijevanje dendritičnih stanica	Nije opisana
	HMGB1	TLR2, TLR4, RAGE i TIM3	P i A	Privlačenje/aktivacija imunskih stanica	Migracija/proliferacija matičnih stanica, proangiogeni medijator
	IL1a	IL-1R	P	Jako proupalno djelovanje	Zaštita u ranoj fazi upale
	IL33	ST2	P	Sekrecija proupalnih i Th2 citokina	Proliferacija epitelnih stanica i produkcija mukusa u crijevu
<b>Citosol</b>	ATP	P2Y2 and P2X7	P i A	Privlačenje makrofaga, produkcija IL-1 $\beta$ od strane dendritičnih stanica, antitumorski imunوسي odgovor	Migracija/proliferacija epitelnih i endotelnih stanica, proangiogeni učinak
	F-aktin	DNGR1	P	Uloga u prepoznavanju nekrotičnih stanica pomoću dendritičnih stanica	Nije opisana

	Ciklofilin A	CD147	A	Privlačenje upalnih stanica, otpuštanje upalnih medijatora	Nije opisana
<b>Citosol</b>	HSP proteini	CD91, TLR2, TLR4, SREC1 i FEEL1	P, S i A	Privlačenje imunskih stanica, sazrijevanje dendritičnih stanica, antitumorska imunost ovisna o T stanicama	Uklanjanje ostataka oštećenja, proliferacija/migracija stanica i sinteza kolagena u koži
	Kristali mokraćne kiseline	NLRP3	P	Sazrijevanje dendritičnih stanica, i privlačenje neutrofila	Nije opisana
	S100 proteini	TLR2, TLR4, RAGE	P	Snažna imunostimulacijska aktivnost, privlačenje monocita i neutrofila	Proliferacija/diferencijacija mioblasta
<b>Mitohondrij</b>	Mitohondrijska DNA	TLR9	P	Aktivacija makrofaga i neutrofila	Nije opisana
	Mitohondrijski transkripcijski čimbenik A	RAGE i TLR9	P	Aktivacija dendritičnih stanica, otpuštanje interferona tipa 1	Nije opisana
<b>ER</b>	Kalretikulin	CD91	P i S	Snažni „pojedi me“ signal, posrednik tumorske imunogeničnosti	Stanična migracija/proliferacija, sinteza izvanstaničnog matriksa

(skraćenice: P, pasivno otpuštanje; A, aktivna sekrecija; S, izlaganje na staničnoj površini; ER, endoplazmatski retikulum)

### 1.3.3. Uloga DAMP molekula u urođenoj imunosti

Kao odgovor na mikrobnu infekciju ili sterilnu ozljedu stanica ili tkiva, alarmini / DAMP molekule se oslobađaju i pokreću urođeni, odnosno upalni imunosni odgovor. On uključuje aktivaciju rezidentnih leukocita (npr. makrofaga, dendritičnih stanica, mast stanica itd.), proizvodnju upalnih medijatora (citokina, kemokina i lipidnih metabolita), privlačenje neutrofila i monocita / makrofaga, a ima za cilj uklanjanje napadajućih mikroorganizama i ozlijeđenih tkiva (Yang i sur., 2017).

Mnogi alarmini su kemotaktični čimbenici za različite vrste leukocita, bilo direktno ili posredno. Posredno, aktiviranjem različitih leukocita uz pomoć alarma proizvode se mnogi kemokini kao što su CXCL5, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8 i CCL20, odnosno leukocitni kemoatraktanti tijekom razvijanja urođenog imunosnog odgovora. Svi testirani  $\alpha$ - i  $\beta$ -defenzini kralježnjaka djeluju kemotaktično na nezrele dendritične stanice, neutrofile, monocite, makrofage i određene podskupine T stanica. EDN, HSP proteini, granulizin, proteini S100 i HMGB1 kemoatraktanti su za nezrele neutrofile, mast stanice, monocite, dendritične stanice i stanice prirodne ubojice (eng. natural killer, NK), a IL-33 za neutrofile i Th2 limfocite (Yang i sur., 2017).

Uz to, neki alarmini također pojačavaju ekspresiju adhezijskih molekula na endotelnim stanicama i leukocitima, pa tako primjerice, u *in vitro* eksperimentima izvanstanični HMGB1 povećava endotelnu ekspresiju (eng. intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) i vaskularne stanične adhezijske molekule 1 (eng. vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1). Na taj način alarmini potiču izlazak leukocita iz krvnih žila, njihovo kretanje prema mjestu upale i infiltraciju tijekom urođenog imunosnog odgovora (Fiuza i sur., 2003).

### 1.3.4. Uloga endogenih DAMP molekula u stečenoj imunosti

Osim što za cilj imaju uklanjanje patogenog agensa (mikroba ili mrtvih / oštećenih stanica), urođeni / upalni imunosni odgovori također potiču reakcije stečenog imunosnog odgovora aktivacijom stanica za internalizaciju, obradu i prezentaciju antigena. To se postiže sazrijevanjem / aktivacijom dendritičnih stanica, koje u perifernim tkivima počinju ekspimirati CCR7, molekulu koja im omogućuje migriranje u limfne čvorove interakcijom s CCL19 / 21 ekspimiranim na

visokim endotelnim venulama u kojima potiču diferencijaciju naivnih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T stanica u pomagačke CD4<sup>+</sup> T (Th) i citotoksične CD8<sup>+</sup> T stanice. Kao što je prethodno spomenuto, svi alarmini mogu potaknuti sazrijevanje / aktivaciju dendritičnih stanica i na taj način doprinijeti razvoju stečene imunosti. Aktivirane dendritične stanice također prenose intaktne antigene folikularnim dendritičnim stanicama za aktivaciju antigen-specifičnih B stanica u zametnom centru. Alarmini sudjeluju i u određivanju vrste stečenog imunskog odgovora. Ljudski  $\alpha$  defenzini potiču i Th<sub>1</sub> i Th<sub>2</sub> vrstu imunskog odgovora. HMGB1 inducira Th<sub>1</sub>-polarizirani imunski odgovor, što dovodi do stvaranja TNF- $\alpha$  i interferona  $\gamma$ . Alarmini EDN i IL-33 potiču Th<sub>2</sub> imunski odgovor. EDN inducira ovalbumin- specifične imunskie odgovore karakterizirane povišenim razinama IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13, ali ne i interferona  $\gamma$ , što je tipično za Th<sub>2</sub> odgovor (Yang i sur., 2017).

#### **1.4. Uloga DAMP molekula u upalnom procesu KOPB-a**

Epitel dišnih putova čini prvu prepreku udahnutim iritansima (štetnim plinovima i česticama prisutnim u dimu cigarete), odvajajući plućno tkivo od okoline. Dim cigarete i drugi štetni plinovi i čestice mogu uzrokovati oštećenje rezidentnih stanica u plućima, što može izazvati više vrsta regulirane i neregulirane stanične smrti. Nekrotična i nekroptična stanična smrt glavni su, ali ne i jedini oblici stanične smrti koji dovode do oslobađanja različitih DAMP molekula u izvanstanični prostor (Pouwels i sur., 2014). Učinkovito uklanjanje apoptotskih stanica, također poznato kao eferocitoza, ključno je za kontrolu potencijalno šetnog učinka upale i ubrzavanje popravka tkiva. Apoptotske stanice „gutaju“ makrofagi, dendritičke stanice, kao i neke vrste epitelnih stanica (McCubrey i Curtis, 2013).

U ranom stadiju apoptoze, većina DAMP molekula zadržava se u apoptotskim tjelešcima te bivaju fagocitirane prije nego što se mogu vezati na PRR receptore, no tijekom sekundarne nekroze može doći do njihovog oslobađanja. Sekundarna nekroza nastaje kada se apoptotske stanice ne uklanjaju učinkovito fagocitozom, kao što je uočeno kod bolesnika s KOPB-om (Pouwels i sur., 2014). Kod pušača s KOPB-om nađen je povećan broj apoptotskih bronhijalnih epitelnih stanica (s povećanom ekspresijom mRNA za kaspazu-8 i p53) u usporedbi s pušačima bez KOPB-a (Gogebakan i sur., 2014).

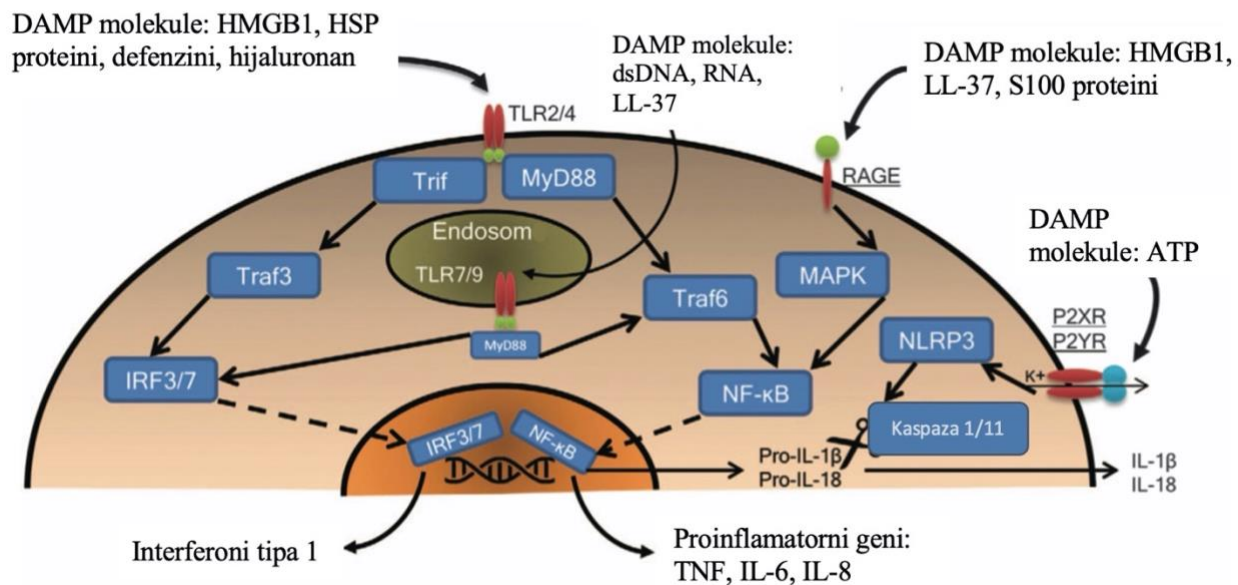
Slaba ekspresija receptora TLR2 i TLR3, eferocitnih receptora CD31, CD44 i CD91, glavnog sustava tkivne podudarnosti (eng. human leukocyte antigen, HLA) klase II i CD80 na površini plućnih makrofaga kod osoba s KOPB-om mogla bi pridonijeti ovom fagocitnom defektu. Jedan od potencijalnih mehanizama ove niske razine receptora koji sudjeluju u prepoznavanju čestica i patogena u KOPB-u su visoka razina oksidacijskog stresa i proteolitičke reakcije koje smanjuju eferocitne opsonine i cijepaju eferocitne receptore, što dovodi do nakupljanja apoptotskih stanica i njihovih ostataka u plućnome tkivu bolesnika s KOPB-om. Apoptotske stanice koje se ne eliminiraju podliježu sekundarnoj nekrozi koja stimulira NKT stanice, aktivira dendritične stanice i potiče sazrijevanje T stanica te daljnje oslobađanje upalnih medijatora koji smanjuju eferocitozu, što uzrokuje začarani krug (Akata i van Eeden, 2020).

Akata i suradnici (2020) su identificirali jedinstvenu populaciju makrofaga u uzorcima BAL-a ispitanika s KOPB-om (stupanj 1-3 prema GOLD-u) kojima su nedostajala dva važna M1 (CD40) i M2 (CD163) biljega i koji bili slabo ili nepolarizirani (negativni za M1 i M2 fenotip). Nepolarizirani makrofagi čine većinu makrofaga kod bolesnika s KOPB-om, a njihova brojnost raste s povećanjem težine KOPB-a. Ti nepolarizirani makrofagi također su proupalne prirode, s lošom fagocitnom funkcijom.

#### 1.4.1. Signalni putovi koje aktiviraju DAMP molekule relevantne kod bolesnika s KOPB-om

Vežanjem DAMP molekula za PRR receptore, dolazi do aktivacije urođenog imunskog sustava, odnosno oslobađanja proupalnih citokina različitim putovima (**Slika 3**). TLR2 i TLR4 receptori mogu se aktivirati vežanjem npr. HMGB1, HSP proteina, defenzina i hijaluronana, što može uzrokovati otpuštanje interferona tipa 1 posredovano s IRF3 aktivacijom Trif / Traf3 / IRF3 puta. Vežanje na TLR2 / 4 receptore također može aktivirati MyD88 / Traf6 / NF- $\kappa$ B put i dovesti do oslobađanja proupalnih citokina (TNF, IL-6 i IL-8). Vežanje dvolančane DNA (dsDNA), RNA i LL-37 na TLR7 i TLR9 receptore može putem IRF7 uzrokovati oslobađanje interferona tipa I ili putem MyD88 / NF- $\kappa$ B puta posredovati u oslobađanju proupalnih citokina. Vežanje HMGB1, LL-37 i S100 proteina za RAGE uzrokuje oslobađanje proupalnih citokina, a posredovano je signalnim putom koji uključuje MAPK kinaze i NF- $\kappa$ B. Izvanstanični ATP se može vezati na purinske P2X i P2Y receptore, što uzrokuje izlazak K<sup>+</sup> iz stanice i aktivaciju NLRP3 inflamasma

koji aktivira kaspazu-11 i kaspazu-1, a koje dalje mogu cijepati pro-IL-1 $\beta$  i pro-IL-18 (koji se sintetiziraju nakon aktivacije NF- $\kappa$ B) u njihove zrele oblike, nakon čega se izlučuju iz stanice. Pokazalo se da su upravo ove navedene DAMP molekule (uz još neke) povišene u bolesnika s KOPB-om (Pouwels, 2014).



**Slika 3.** Vezanje receptora za prepoznavanje uzoraka (PRR) s DAMP molekulama relevantnim za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (preuzeto iz Pouwels, 2014).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična opstruktivska plućna bolest postaje sve veći javnozdravstveni izazov u svijetu. Prema nekim podacima, 2016. godine 251 milijun osoba u svijetu oboljelo je od KOPB-a (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-copd>). Ova bolest predstavlja jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta, zauzimajući treće mjesto uzroka smrtnosti na globalnoj razini (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). U razvijenim zemljama pušenje cigareta je glavni čimbenik rizika za razvoj KOPB-a, odnosno glavni izvor štetnih čestica i plinova koji uzrokuju upalu dišnih putova. Oko 90 % svih smrtnih slučajeva od KOPB-a može se pripisati upravo pušenju (Tashkin i Murray, 2009). Postoje dokazi koji ukazuju na razlike u imunom i upalnom procesu u plućima pušača s KOPB-om i zdravih pušača/nepušača. Poremećaji u apoptotskom procesu povezani s ozljedom tkiva sve više se smatraju važnima u patogenezi ove bolesti. Dokazano je da dim cigarete inducira ne samo apoptozu već i nekroptozu i naknadno oslobađanje DAMP molekula iz epitelnih stanica dišnih putova.

Povećani upalni odgovor dišnih putova može predstavljati rani patološki događaj i tu biljezi upale, poput DAMP molekula mogu igrati ključnu ulogu kao potencijalni biomarkeri. Spirometrija je trenutno najpouzdanija metoda otkrivanja KOPB-a. No čini se da opstrukcija dišnih putova nije odraz samog početka bolesti. Kada se spirometrija koristi kao jedina metoda analize, sve ostale patološke komponente ovakvih složenih sistemskih bolesti ostaju zanemarene. Stoga postoji potreba za novim dijagnostičkim biomarkerima, poput DAMP molekula koji bi omogućili rano i cjelovito utvrđivanje bolesti, a osim toga, i bili korisni kako u predviđanju odgovora na terapiju tako i u procjeni učinkovitosti terapije i aktivnosti bolesti. Za sve navedeno neophodno je bolje razumijevanje patogeneze KOPB-a, posebno one koja čini razliku od posljedica učinaka pušenja samog po sebi. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti sve dostupne znanstvene studije i prikazati dosad istražene DAMP molekule u kontekstu patofiziološke podloge pušača s KOPB-om u odnosu na pušače bez KOPB-a i/ili nepušače te njihovu korelaciju s parametrima plućne funkcije i težinom bolesti.



### 3. MATERIJALI I METODE

Za izradu ovog diplomskog rada korištena je stručna i znanstvena literatura na temu DAMP molekula kao upalnih medijatora kod bolesnika s KOPB-om. Pritom su korišteni radovi objavljeni u stručnim i znanstvenim časopisima. Znanstveni članci su pronađeni *on-line* u bazi podataka PubMed. PubMed je slobodno dostupna tražilica koja primarno pristupa Medlineu, najpoznatijoj medicinskoj bibliografskoj bazi. Pretraživanje je provedeno po ključnim pojmovima:

- *COPD,*
- *damage-associated molecular patterns,*
- *alarmins,*
- *DAMP in COPD,*
- *cigarette smoke induced DAMP,*
- *HSP27 and COPD,*
- *HSP70 and COPD,*
- *S100 proteins and COPD,*
- *galectins and COPD,*
- *antimicrobial peptides and COPD,*
- *LL-37 and COPD,*
- *uric acid and COPD,*
- *HMGB1 and COPD,*
- *mitochondrial DNA and COPD,*
- *extracellular ATP and COPD.*

U radu su također korišteni podaci dostupni na web stranicama ([www.goldcopd.org](http://www.goldcopd.org); [www.who.int](http://www.who.int)). Pri proučavanju literature izdvojena su najvažnija saznanja i zaključci.

## 4. RASPRAVA

### 4.1. DAMP molekule citoplazmatskog podrijetla

#### 4.1.1. Proteini toplinskog šoka (eng. heat shock proteins, HSPs)

Proteini toplinskog šoka (eng. heat shock proteins, HSPs) skupina su visoko očuvanih proteina prisutnih u gotovo svim stanicama. Imaju ključne uloge u ispravnom presavijanju novosintetiziranih polipeptida, odmatanju i translokaciji proteina, kao i sastavljanju i rastavljanju proteinskih kompleksa i stoga su nazvani molekularnim šaperonima. Prvi put su otkriveni 1962. godine u pregrijanim ličinkama *Drosophila melanogaster*, zbog čega su i dobili svoj naziv. Kasnijim istraživanjima utvrđeno je kako su HSPs prisutni u svim prokariotima i eukariotima (Kaul i Thippeswamy, 2011). U normalnim fiziološkim uvjetima HSPs nalaze se u niskim koncentracijama unutar stanice. Međutim, različiti stresni podražaji, uključujući okolišne (UV zračenje, visoka temperatura, teški metali i kiseline), patološke (virusne, bakterijske i parazitske infekcije, upala, malignost ili autoimunost) i fiziološke podražaje (čimbenici rasta, stanična diferencijacija, hormonska stimulacija ili razvoj tkiva) potiču izraziti porast unutarstanične sinteze HSPs (Asea, 2008).

Raspon veličina varira od 10 do više od 100 kDa. Štoviše, njihova se posebna mjesta i fiziološke uloge unutar stanice mijenjaju ovisno o njihovoj veličini (Bolhassani i Agi, 2019).

Ovi su proteini klasificirani u šest glavnih obitelji na temelju njihove molekularne mase kao HSPH (Hsp110), HSPC (Hsp90), HspA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), HspB (mali HSPs) te obitelji šaperonina HspD / E (Hsp60 / Hsp10) i šaperonina citosola eukariota (eng. chaperonin containing tailless complex polypeptide 1, CCT) (Milani i sur., 2019). U fiziološkim uvjetima, HSPs mogu činiti približno 1-5 % ukupnih staničnih proteina. Među različitim članovima jedne obitelji HSP, ali ne i među različitim obiteljima, ovi su proteini vrlo homologni u gotovo svim vrstama. Čak i prokariotski i eukariotski članovi obitelji HSP70 dijele više od 50 % svojih aminokiselinskih sekvenci (Multhoff, 2006).

S druge strane, HSPs se često dijele na konstitutivne i inducibilne oblike. Primjerice, konstitutivno eksprimirani Hsp73 i Hsp72 induciran stresom su se pokazali međusobno povezanima. Oba proteina bi mogli djelovati kao molekularni šaperoni i tako privremeno biti u interakciji s

novonastalim polipeptidima. Unutar stanice, osim svoje glavne uloge kao šaperoni, HSPs imaju i citoprotektivnu funkciju, gdje u stanju stresa spašavaju esencijalne proteine sprječavanjem agregacije i recikliranjem oštećenih proteina, održavanjem stabilnosti membrane te općenito održavajući stanični rad što optimalnijim, a također imaju ključnu ulogu u procesu autofagije te inhibiciji apoptoze (Milani i sur., 2019).

#### 4.1.1.1. HSPs u izvanstaničnom prostoru

HSPs osim unutar stanice, također mogu biti prisutni i u izvanstaničnom prostoru. Izvan stanice, ovi proteini imaju brojne uloge u aktiviranju imunskog odgovora, uključujući onu u prezentaciji antigena. U osnovi se svi antigeni stvoreni unutar stanica razgrađuju u peptide koji se zatim povezuju s HSPs iz obitelji HSP60, HSP70 i HSP90 te eksprimiraju na površini stanice putem molekula MHC klase 1. Ovi proteini predstavljaju antigeni “otisak“ stanica ili tkiva iz kojih dolaze, budući da proteini toplinskog šoka (HSP70 i HSP90) izolirani iz karcinoma ili iz stanica zaraženih virusom u gotovo svim slučajevima imaju vezane peptide koji su dijelovi antigena specifičnih za karcinom ili virusnih antigena, zbog čega imaju ključnu ulogu u imunskom nadzoru tumora i autoimunosti. Čak i samo izlaganje članova obitelji HSP70 i HSP90 antigen prezentirajućim stanicama uzrokuje brojne promjene na stanicama, uključujući inicijaciju signala koji uzrokuju upalu. Kada su stanice sisavaca pod stresom, određeni HSPs se oslobađaju iz stanica ili eksprimiraju na staničnoj površini u malim, ali dovoljno značajnim količinama. Drugim riječima, i samostalni proteini toplinskog šoka mogu djelovati kao alarmi (Srivastava, 2008).

#### 4.1.1.2. Utjecaj dima cigarete na vrijednosti HSPs

Pojedina otkrića sugeriraju da bi oksidacijski stres i HSPs mogli biti implicirani u razvoju plućnih bolesti uzrokovanih cigaretnim dimom, poput KOPB-a (Zhang i sur., 2017; Szoka i sur., 2019). Somborac Bačura i suradnici (2018) pokazali su kako su u podlogu mehanizma citotoksičnosti i oksidacijskog oštećenja alveolarnih epitelnih stanica ekstraktom dima cigarete (eng. cigarette smoke extract, CSE) uključeni proteini toplinskog šoka HSP70, HSP32 i HSP27. U staničnoj kulturi komercijalno dostupnih alveolarnih epitelnih stanica (A549) nakon izlaganja različitim koncentracijama CSE-u, staničnu citotoksičnost potvrdili su povišenom aktivnošću laktat-

dehidrogenaze, te su identificirali povećani broj apoptotskih/nekrotičnih stanica. Promjene u ekspresiji HSP70, HSP32 i HSP27 u stanicama izloženim različitim koncentracijama CSE-a ispitivane su Western blot metodom. Nakon 4-satne inkubacije s dimom cigarete, nije bilo promjena u ekspresiji proteina toplinskog šoka. Nakon 6-satne inkubacije, HSP70 i HSP32 bili su inducirani uz veće koncentracije CSE-a (5 %, 10 % i 20 %), dok su svi ispitivani proteini toplinskog šoka bili povišeni nakon 8-satnog tretmana s još višim koncentracijama ekstrakta dima cigareta te su ostali povišenim tijekom narednih 48 sati. Povećane koncentracije malondialdehida i smanjene koncentracije reduciranih tiolnih skupina odrazile su povećan oksidacijski stres nađen u stanicama. Također su pokazali da izlaganje alveolarnih epitelnih stanica CSE-u različito aktivira MAPK, ali ne utječe na razinu ekspresije ukupnih kinaza.

#### 4.1.1.3. HSP27

Brojne studije pokazale su kako se upalni odgovor i apoptoza koji se uočavaju kod bolesnika s KOPB-om povezuju s povećanim koncentracijama izvanstaničnih proteina toplinskog šoka. Koncentracija HSP27 mjerena u serumu bolesnika s KOPB-om značajno je viša u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima, dok takve razlike nema između zdravih nepušača i pušača bez KOPB-a. Koncentracije serumskog HSP27 pokazale su se značajno povišenima kako u stadiju 1-2 (prema GOLD-u), tako i u stadiju 3-4 (Ünver i sur., 2016), odnosno vrijednosti HSP27 u serumu rastu s težinom bolesti (Hacker i sur., 2009). Ovaj učinak mogao biti posljedica povećane destrukcije tkiva, posebno u kasnim fazama KOPB-a i širenja upale na druge organske sustave što rezultira sistemskim povećanjem HSP27. Suprotno tome, vrijednosti HSP27 mjerene u BAL tekućini bolesnika s KOPB-om (pušača i bivših pušača) kao odraz lokalnog upalnog mikrokoliša pokazuju negativnu korelaciju s omjerom rezidualnog volumena u odnosu prema ukupnom plućnom kapacitetu (eng. total lung capacity, TLC) ( $RV / TLC$ ), težinom bolesti, odnosno stadijima 1-4 (prema GOLD-u) i BODE indeksom (eng., B-body mass index, O-obstruction, D-dyspnea, E-exercise). S druge strane, ovdje ekspresija HSP27 pozitivno korelira s  $FEV_1$  (Brajer-Luftmann i sur., 2019a). Pušenje cigareta povećava broj i aktivnost cirkulirajućih mijeloidnih supresorskih stanica (eng. myeloid-derived suppressor cells, MDSC). Nađeno je da koncentracija HSP27 korelira s postotkom MDSC mjerenih u BAL-u bolesnika s KOPB-om, ali ne i u serumu, za kojeg nisu nađene povezanosti. Međutim, ova se pojava ne primjećuje kod pušača s normalnom

funkcijom pluća. MDSC inhibiraju proliferaciju T limfocita te induciraju nakupljanje supresivnih regulatornih T limfocita. Štoviše, stimulacija MDSC-a s interferonom- $\gamma$  dovodi do povećane proizvodnje IL-10 i TGF- $\beta$ , najjačih imunosupresivnih citokina. Aktivacija MDSC-a kod KOPB-a povezana je s gubitkom ekspresije  $\zeta$  lanca T-staničnog receptora. Uz to, rezultati analize četveromjesečnog izlaganja cigaretnom dimu, pokazuju povišen broj MDSC-a u koštanoj srži, slezeni i plućima, što je popraćeno smanjenom količinom plućnih dendritičnih stanica (Brajer-Luftmann i sur., 2019b)

#### 4.1.1.4. HSP70

Povećana ekspresija HSP70 pokazala se povezanom s težinom KOPB-a i statusom pušenja (Dong i sur., 2013). Nadalje, novije studije pokazale su imunomodulatornu ulogu HSPs kada su se ispitivali s obzirom na učinke cigaretnog dima na različite stanice. Studija Huline Tomašković i suradnika (2019a) izvijestila je o proupalnim učincima izvanstaničnog HSP70 (eng. extracellular HSP70, eHSP70), primjenjenog samog i u kombinaciji s CSE-om u primarnim epitelnim stanicama bronha zdravih donora i stanica dobivenih od donora s KOPB-om. Nakon stimulacije s rekombinantnim humanim (rh)HSP70, nađene su povišene koncentracije IL-6 i IL-8, s najjačim odgovorom u stanicama bolesnika s KOPB-om. Primjena samog CSE-a povećava lučenje citokina u svim ispitivanim stanicama, dok primjena rhHSP70 i CSE-a zajedno ima antagonističke interakcije pri otpuštanju IL-8 u stanicama bolesnika s KOPB-om. HSP70 je endogeni ligand za TLR2 i TLR4 (Asea i sur., 2008). U studiji je pokazano da rhHSP70 i CSE primijenjeni pojedinačno smanjuju ekspresiju TLR2 i TLR4 mRNA u stanicama bolesnika s KOPB-om. U stanicama bez dijagnoze KOPB-a, kombinirana primjena smanjila je samo ekspresiju TLR2 mRNA. Ekspresija mRNA za HSP70 (pokazatelj unutarstaničnog HSP70), smanjena je u stanicama s dijagnozom KOPB-a, nakon pojedinačnog izlaganja CSE-u i rhHSP70, ali ne i njihovom kombinacijom. Nasuprot tome, u stanicama bez KOPB-a samo je zajednički tretman suprimirao ekspresiju gena za HSP70. Zaključeno je da bi ovi svi učinci mogli biti potencijalni modulatori upale kod bolesnika s KOPB-om.

eHSP70 može modulirati upalni odgovor na razini ekspresije proteina i gena u stanicama humanih monocita te makrofagima izloženih dimu cigarete. Ti se učinci ostvaruju putem MAPK i NF- $\kappa$ B signalnih putova. Kada su i eHSP70 i komponente cigaretnog dima prisutni u krvi npr. bolesnika

s KOPB-om, od kojih su većina pušači, njihove interakcije mogu izazvati modulaciju sistemske upale, što bi moglo dovesti do neprikladnih upalnih reakcija (Hulina Tomašković i sur., 2019b). Koncentracija eHSP70 povećana je u plazmi bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim kontrolama. Nadalje, među bolesnicima sa stabilnim KOPB-om podijeljenih obzirom na GOLD ABCD klasifikaciju (težinu simptoma i povijest egzacerbacija) kao i samo prema GOLD stadijima (2 – 4 stupanj), postoje statistički značajne razlike u plazmatskim koncentracijama eHSP70, odnosno povećavanje koncentracije eHSP70 može razlikovati svaku skupinu bolesnika s obzirom na obje podjele. Koncentracije eHSP70 tako su najviše u skupini GOLD 4 i skupini GOLD D, a eHSP70 pokazao se povišenim čak i u GOLD A i GOLD 2 (što je u kliničkoj praksi obično najniži GOLD stupanj kada pojedinci zatraže liječničku pomoć) u usporedbi s ukupnom kontrolnom skupinom. Nadalje, bolesnici s KOPB-om pokazuju povišene vrijednosti eHSP70 u plazmi u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima. Međutim, zdravi pušači imaju više koncentracije eHSP70 u plazmi u usporedbi sa zdravim nepušačima, i oni kao takvi mogli bi biti osjetljiviji na promijenjene upalne reakcije izazvane s eHSP70, a neki od njih u budućnosti bi mogli čak razviti KOPB, budući da je otkriveno da bolesnici koji pripadaju podskupinama GOLD 2 i GOLD A pokazuju slične vrijednosti eHSP70 kao pušači s normalnom plućnom funkcijom (Hlapčić i sur., 2020).

Trajna aktivacija NLRP3 inflammasoma mogla bi biti uključena u patogenezu KOPB-a. Inflammasom je multimerni kompleks koji upravlja sazrijevanjem i otpuštanjem proupalnih citokina sličnih IL-1 kroz regulaciju proteolitičke obrade ovisne o kaspazi-1. (Colarusso i sur., 2017). Tako eksperimentalno udisanje duhana na mišjem modelu pokazuje da inhibicija kaspaze-1 značajno smanjuje upalu dišnih putova (Churg i sur., 2009). Antagonističko djelovanje eHSP70 na aktivaciju NLRP3 inflammasoma i IL-1 $\beta$  nedavno su dokazali Rumora i suradnici (2021) na uzorku monocitnih (komercijalnih THP-1 stanica, makrofaga porijeklom iz monocita izoliranih iz krvi zdravih donora) i komercijalnih bronhijalnih epitelnih stanica (NHBE i NCI-H292), te tako potvrdili njegovu ulogu u moduliranju upalnog odgovora kakav se nalazi kod primjerice bakterijskih infekcija bolesnika s akutnom egzacerbacijom.

#### 4.1.2. S100 proteini

Unutarstanične razine  $\text{Ca}^{2+}$  i signalizacija pomoću  $\text{Ca}^{2+}$  reguliraju se pomoću nekoliko proteina transportera i membranskih kanala za  $\text{Ca}^{2+}$ . Ove vezujuće proteine karakterizira EF-šaka-vezujući motiv koji na taj način prenosi  $\text{Ca}^{2+}$  signale i time regulirajući ciljne proteine u njihovoj  $\text{Ca}^{2+}$  vezanoj konformaciji. U superobitelji s motivom EF-šake, proteini S100 čine najveću podskupinu, s trenutno poznatih 25 članova. Ekspimiraju se isključivo u kralježnjacima, a svaki od njih ima jedinstveni profil ekspresije i raspodjele među različitim vrstama tkiva i stanica. Svaki član obitelji proteina S100 ima sličnu molekularnu masu od 10 do 12 kDa i svaki od njih dijeli 25 – 65 % sličnosti u svom aminokiselinskom slijedu. Postoje kao antiparalelni homo- i heterodimeri, pri čemu se svaki monomer sastoji od dvije EF-šake heliks-petlja-heliks (EF-1 i EF-2) povezanih zglobnom regijom i uz njih bočno nalaze se hidrofobni ostatci na N- i C- terminalnom kraju (Gonzalez i sur., 2020). S100 proteini uključeni su u kontrolu velikog broja kako unutarstaničnih tako i izvanstaničnih funkcija. Unutar stanica sudjeluju u regulaciji proliferacije, diferencijacije, apoptoze, homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$ , metabolizma, upale, migracije / invazije interakcijama s različitim ciljnim proteinima, uključujući enzime, citoskeletne podjedinice, receptore, transkripcijske čimbenike i nukleinske kiseline.

Izvanstanični S100 proteini djeluju autokrino i parakrino putem aktiviranja površinskih receptora: receptora povezanih s G-proteinima, receptora čistača ili proteoglikana heparan sulfata i N-glikana. Kao izvanstanični signali, S100 proteini reguliraju proliferaciju stanica, diferencijaciju, preživljavanje i migraciju u normalnim i patološkim stanjima, upalu i obnavljanje tkiva i / ili provode antimikrobnu aktivnost. Određeni proteini S100 također se nalaze u serumu i drugim biološkim tekućinama tijekom patoloških stanja.

Nakon staničnog oštećenja / stresa brojni S100 geni inducirani su odgovarajućim faktorima rasta, citokinima i ligandima TLR receptora. U tim se okolnostima S100 proteini otpuštaju u izvanstanični prostor gdje mogu djelovati kao DAMP molekule koje aktiviraju imunosne i endotelne stanice vežući se na TLR receptore i RAGE receptore te posreduju u funkcijama urođenog i stečenog imunosnog sustava, potiču kretanje tumorskih stanica i / ili sudjeluju u obnavljanju tkiva (Donato i sur., 2013).

Povećana ekspresija gena za pojedine RAGE liganade (među kojima i S100 proteine: S100A8, S100A9, S100A12) opažena je u primarnim stanicama humanog bronhijalnog epitela kao posljedica tretiranja istih ekstraktom cigaretnog dima (Li i sur., 2015). Vezanje S100 liganada na RAGE povećava ekspresiju adhezijskih molekula ICAM-1 i VCAM-1 na endotelnim stanicama i proupalnih citokina (TNF- $\alpha$ ) iz drugih upalnih stanica (Gonzalez i sur., 2020). Dim cigarete je kritični stimulator ekspresije RAGE te je nađen pojačano eksprimiran u epitelu dišnih putova bolesnika s KOPB-om, posebno pušača s KOPB-om (Chen i sur., 2014).

#### 4.1.2.1. S100A8

U ranijim studijama u *in vivo* mišjem modelu, analizom BAL tekućine pokazano je da dim cigarete uzrokuje povećanje ekspresije S100A8 u ovisnosti o vremenu (Pouwels i sur., 2016a) te da štiti od akutne ozljede pluća uklanjanjem ROS-a i smanjenjem proupalnih medijatora i kemokina što dovodi do suzbijanja infiltracije neutrofila (Hiroshima i sur., 2014; Hiroshima i sur., 2017). Ova opažanja postavila su S100A8 kao potencijalni ključni čimbenik koji štiti od plućnih bolesti u kojima je oksidacijski stres dio patofiziologije.

Drugi nalazi također sugeriraju njegovu citoprotektivnu ulogu u ozljedi pluća uzrokovanoj cigaretnim dimom. U opsežnoj *in vitro* studiji Lina i suradnika (2019) pronađena je povećana ekspresija S100A8 na razini proteina i mRNA u svježe izoliranim pneumocitima tipa 2 pušača i kultiviranim primarnim alveolarnim stanicama tipa 2 izloženih cigaretnom dimu. Međutim, otkrivena je značajno niža ekspresija proteina S100A8 u plućnom tkivu i pneumocitima tipa 2 osoba s emfizemom u usporedbi s nepušačima i pušačima, koja je korelirala s izmjerenim visokim oksidacijskim stresom u emfizemu. Korelaciju ekspresije S100A8 i stupnja progresije emfizema utvrdili su uvidom u tkivo prikupljeno iz dva područja koja odgovaraju blago i teško oštećenim područjima pluća istog bolesnika. Rezultati su pokazali smanjeno eksprimiran S100A8 protein u područjima s teškim oštećenjem u usporedbi s blagim emfizemom, čime je pokazano da bi gubitak funkcije S100A8 mogao pridonijeti razvoju emfizema.

KOPB i astma dijele niz kliničkih i bioloških sličnosti koje često čine njihovu diferencijaciju složenom, posebno u pušača s atopijom u anamnezi. Problem je to sindroma preklapanja astme i KOPB-a (eng. asthma-COPD overlap syndrome, ACO) koji je heterogen i pomalo nedosljedan



entitet, a kojega karakterizira široka klinička i biološka varijabilnost. Trenutno ne postoje široko prihvaćeni kriteriji za klasifikaciju, pa dijagnoza ACO u konačnici ovisi o usvojenoj definiciji i populaciji koja se proučava. To izuzetno otežava razmjenu znanja i provođenje kliničkih ispitivanja posebno dizajniranih za proučavanje ovog entiteta (Cosío i sur., 2018). No, S100A8 pokazao se diferencijalnim biomarkerom kada se analizirao sputum ispitanika s astmom, KOPB-om i ACO-om, pušača i nepušača. Njegova koncentracija u sputumu bolesnika s ACO-om bila je značajno povišena u usporedbi s pušačima i nepušačima. Sputum bolesnika s ACO-om pokazao je porast koncentracije proteina S100A8 u usporedbi s onima od astmatičara, dok su razine bile smanjene u usporedbi s onima kod bolesnika s KOPB-om, a koncentracija S100A8 u sputumu od svih ispitanika negativno je korelirala s FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub> (% predviđene vrijednosti) i omjerom FEV<sub>1</sub> / FVC (Huang i sur., 2019).

#### 4.1.2.2. S100A9

Na promjene u plućnoj funkciji povezane sa starenjem, ali i izloženosti cigaretnom dimu pokazalo se da utjecaj ima protein S100A9 ili kalgranulin B. U studiji Railwah i suradnika (2020) vrijednosti ovog proteina nađene su značajno povišene u uzorcima BAL-a bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima. Koncentracije S100A9 u zdravim nepušača, zdravim pušača i ispitanika s KOPB-om koreliraju s dobi i gubitkom plućne funkcije. Na mišjem modelu potvrđeno je da akutna i kronična izloženost dimu cigarete povećava ekspresiju i izlučivanje S100A9. S100A9 lokaliziran je na infiltrirajuće imunosne stanice kao i na epitelne stanice dišnih putova. S druge strane, histološka analiza pluća miševa s nedostatkom S100A9 pokazala je značajno manje proširenja zračnog prostora, broj zračnih prostora i duktalnu / destruktivnu frakciju u usporedbi sa životinjama izloženim dimu cigareta bez takvog nedostatka. Time su pokazali da S100A9 pridonosi strukturnim i fiziološkim promjenama na plućima (Railwah i sur., 2020). S100A9 također potiče otpuštanje enzima koji igraju važnu ulogu u remodeliranju tkiva, uništavanju hrskavice i transmigraciji leukocita. Povećana ekspresija metaloproteinaza matriksa (eng. matrix metalloproteinase, MMP) dokumentirana je kod fibroze i plućnih bolesti, stanja često povezanih s prisutnošću proteina S100. S100A9 inducira ne samo oslobađanje MMP-9 već i njenu aktivaciju (Simard i sur., 2010). Budući da fibroblasti igraju glavnu ulogu u proizvodnji i održavanju izvanstaničnog matriksa u emfizemu, u studiji Railwah i suradnika (2020) primarni fibroblasti

pluća tretirani su inhibitorom kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (eng. extracellular signal-regulated kinase, ERK) ili c-RAF inhibitorom, što je rezultiralo manjim stvaranjem MMP-3, MMP-9, MCP-1, IL-6 i IL-8 induciranim s S100A9. Utišavanje TLR4, RAGE receptora, ili induktora metaloproteinaze izvanstaničnog matriksa (EMMPRIN) spriječilo je S100A9-induciranu fosforilaciju ERK i c-RAF. Još jedno važno saznanje je proizašlo iz studije. Također, utvrđeno je da S100A9 protein utječe na gubitak plućne funkcije ovisan o dobi čak i u odsutnosti cigaretnog dima.

#### 4.1.2.3. S100A8/S100A9 (kalprotektin)

S100A8 može djelovati neovisno ili može sa S100A9 oblikovati heterodimer kalprotektin. U upalnom stanju aktivirani granulociti neprestano luče kalprotektin i na taj način aktiviraju mnoge nizvodne signalne putove i preusmjeravaju upalne i tumorske mehanizme poput stvaranja upalnih čimbenika, interakcija protein-protein, stvaranja MMP-a i remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Stoga se pretpostavilo da bi heterodimer S100A8 / S100A9 mogao biti povezan s upalom te uključen u razvoj i progresiju KOPB-a (Shabani i sur., 2018). Točna uloga kalprotektina u patogenezi stabilnog KOPB-a do danas još nije razjašnjena. No, poznato je da serumski heterodimer negativno korelira s plućnom funkcijom, a pozitivno s vrijednostima plinova u arterijskoj krvi i upalnim citokinima kod bolesnika s akutnim egzacerbacijama KOPB-a u usporedbi sa zdravim ispitanicima (Huang i sur., 2020). Štoviše, koncentracija serumskog heterodimera pokazuje paralelno povećanje s težinom akutne egzacerbacije, pa je tako koncentracija S100A8 / S100A9 nađena viša kod bolesnika sa stadijem 4, nego kod stadija 1–2 i stadija 3 (bolesnici s akutnom egzacerbacijom klasificirani su na temelju FEV<sub>1</sub> %).

#### 4.1.2.4. S100A4

Studija Reimanna i suradnika (2015) došla je do zaključka o mogućoj ulozi S100A4 u remodeliranju vaskulature kod bolesnika s KOPB-om. Plućno tkivo dobiveno je iz eksplantiranih pluća pet bolesnika s KOPB-om (stadij 3-4) i pet donora organa kao kontrolnih uzoraka. Usporedno s tim, ispitivanje je provedeno na mišjem modelu emfizema pluća izazvanog cigaretnim dimom (izloženost tijekom 3 i 8 mjeseci) i kontrolama. RT-PCR analiza S100A4 i RAGE mRNA provedena je iz laserski mikrodiseciranih intrapulmonalnih arterija. Povećana

ekspresija S100A4 mRNA nađena je u mikrodisekiranim intrapulmonalnim arterijama bolesnika s KOPB-om u završnoj fazi, dok je ekspresija RAGE mRNA bila usporediva s kontrolama. Visoka ekspresija S100A4 primijećena je ne samo u plućnim arterijama, lokaliziranog u mediji okluzivnih arterija, već i u neomuskulariziranim žilama promjera ~ 50  $\mu\text{m}$ . Porast ekspresije u uvjetima hipoksije potiče se preko hipoksijom induciranih čimbenika (eng. hypoxia-inducible factor, HIF). Slično tome, miševi izloženi dimu cigareta tijekom 8 mjeseci pokazali su znatno povećanje ekspresije mRNA S100A4 u intrapulmonalnim arterijama. Nadalje, uočena je jaka imunosna reaktivnost proteina S100A4 u vaskularnom dijelu, posebno u medijalnom sloju. Međutim, u mišjem modelu stimulus hipoksije na indukciju ekspresije S100A4 mogao se isključiti, budući da miševi nisu imali znakove hipoksije. Objašnjenje za to je stabilnost HIF-1/2, ne samo u hipoksičnim uvjetima, već i u normoksiji u prisutnosti ROS-a, kao što je nikotin, koji inducira ekspresiju HIF-1 $\alpha$  putem mitohondrijskih ROS-a u karcinomu pluća nemalih stanica (Reimann i sur., 2015). To ide u prilog hipotezi da S100A4 može biti uključen u rano vaskularno preoblikovanje čak i u nehipoksičnim, blagim stadijima KOPB-a.

#### 4.1.3. Galektini

Galektini su skupina evolucijski očuvanih proteina prisutnih u kralježnjacima, beskralješnjacima i gljivama. Posjeduju karakteristične domene koje prepoznaju ugljikohidrate (eng. carbohydrate-recognition domains, CRDs) građene od oko 130 aminokiselina, putem kojih imaju sposobnost vezanja  $\beta$ -galaktozida. Do sada je opisano 15 galektina sisavaca. Strukturno se mogu klasificirati u tri skupine: prototip galektine (galektini 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 i 15) koji imaju jednu CRD; tandem galektine (galektini 4, 6, 8, 9 i 12) s 2 različite, ali homologne CRD i skupinu kimernog tipa, čiji je jedini član galektin-3, s C-terminalnom CRD i velikom N-terminalnom domenom koja veže proteine. Galektini se sintetiziraju u citosolu na slobodnim ribosomima. Nakon sinteze mogu ostati u citosolu i sudjelovati u protein-protein interakcijama kao regulatori unutarstaničnih događaja. Primjerice, galektin-12 povezan s kapljicama lipida u adipocitima regulira lipolizu i osjetljivost na inzulin. Galektin-3 u citosolu može spriječiti oslobađanje mitohondrijskog citokroma C i na taj način inhibirati apoptozu, a također može vezati citosolni  $\beta$ -katenin u regulaciji Wnt signalizacije. Citosolni galektin-8 je receptor opasnosti koji cilja oštećene lizosome i endosome za autofagiju. Galektin-1 i galektin-3 također se mogu premjestiti u jezgru, gdje mogu

sudjelovati u prekrajanju pre-mRNA ili stabilizirati interakcije protein-DNA radi poticanja procesa transkripcije. Stanice urođenog imunskog sustava bogate su galektinima. Opisane su razne funkcije galektina granulocita, uključujući aktivaciju, adheziju i migraciju stanica. Galektin-1 i -3 mogu izravno posredovati u vezanju granulocita za izvanstanični matriks i endotelne stanice te tako regulirati migraciju stanica, dok galektin-9 djeluje kao kemotaktički faktor. Antigen-prezentirajuće stanice, tj. makrofagi i dendritične stanice, također eksprimiraju višestruke galektine, uključujući galektin-1, -3 i -9. Galektin-3 izvorno se zvao Mac-2, jer je identificiran na makrofagima (Thiemann i Baum, 2016).

Galektini imaju svoju ulogu u patogenezi KOPB-a. Ekspresija galektina-1 povišena je u uzorcima BAL tekućine bolesnika s KOPB-om i negativno korelira s parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi, a pozitivno s RV-om i BODE indeksom, dok je analizom seruma nađena također negativna korelacija između galektina-1 i razine oksigenacije (Brajer-Luftmann i sur., 2019a).

#### 4.1.3.1. Galektin-3

Dim cigarete uzrokuje disregulaciju ekspresije gena DAMP molekula kod bolesnika s KOPB-om, što je dokazano na primjeru galektina-3 (Pouwels i sur., 2016b). *In vitro*, izloženost cigaretnom dimu može inducirati o dozi ovisno oslobađanje galektina-3 s posljedičnim induciranjem proupalnog odgovora u epitelnim stanicama dišnih putova bolesnika s KOPB-om u usporedbi s kontrolama (trenutni pušači s normalnom plućnom funkcijom, sa slaganjem u statusu pušenja i dobi). Ekspresija mRNA za galektin-3 na početku eksperimenta, prije konzumacije cigareta nije bila različita između skupina, što ide u prilog činjenici da je epitel bolesnika s KOPB-om skloniji aktivnom oslobađanju galektina-3. Ipak, najjači porast otpuštanja galektina-3 primijećen je pri izlaganju višim koncentracijama cigaretnog dima koji je uzrokovao citotoksičnost. To bi moglo ukazivati na uključenost nekroze / nekroptoze u otpuštanje galektina-3 izazvanog cigaretnim dimom, premda u istraživanju nije nađena razlika u odumrlim epitelnim stanicama skupine ispitanika s KOPB-om i kontrolne skupine. Sličan trend uočen je i u uzorcima četkanja bronha mladih osoba s predispozicijom razvoja KOPB-a u usporedbi s mladim neosjetljivim osobama, što sugerira da su razlike u ekspresiji galektina-3 prisutne prije početka bolesti (Pouwels i sur., 2016b).

Nadalje, čini se da bi galektin-3 mogao imati ulogu u akutnim egzacerbacijama KOPB-a. Istraživanje Fenga i suradnika (2017) otkrilo je da razina galektina-3 u serumu raste u fazi akutnog pogoršanja u usporedbi s fazom oporavka kod KOPB-a. Kao upalni biomarker u procjeni egzacerbacije KOPB-a koristi se C-reaktivni protein visoke osjetljivosti (eng. high-sensitivity CRP, hsCRP), dok je pro-natrijuretski moždani peptid (eng. pro-brain natriuretic peptide, pro-BNP) serumski marker za dijagnozu i prognozu kod zatajenja srca kao komorbiditeta kod KOPB-a. U ovoj studiji, galektin-3 pozitivno je korelirao sa serumskim koncentracijama oba biomarkera. Bolesnici s KOPB-om klasificirani su u tri skupine prema statusu pušenja kao nepušači, trenutni pušači i bivši pušači. Rezultati su pokazali najviše koncentracije galektina-3 u skupini trenutnih pušača, a najniže u skupini nepušača bilo u stanju akutne egzacerbacije ili u fazi oporavka (Feng i sur., 2017).

#### 4.1.3.2. Uloga galektina u disfunkciji plućnih makrofaga

Kod bolesnika s KOPB-om nađen je značajan nedostatak u sposobnosti plućnih makrofaga da fagocitiraju apoptotske epitelne stanice dišnih putova (neispravna eferocitoza). Taj višak neuklonjenog staničnog materijala tada može prijeći u sekundarnu nekrozu i uvjetovati kroničnu upalu (Hodge i sur., 2007; Hodge i sur., 2011). Ulogu u takvoj disfunkciji makrofaga, koja se javlja kod bolesnika s KOPB-om ima galektin-3. Interakcija galektina-3 i receptora CD98 inducira 'M2' alternativno aktivirani fenotip makrofaga (s poboljšanom sposobnošću fagocitoze apoptotskih stanica). Mukaro i suradnici (2013) pronašli su smanjene koncentracije galektina-3 i njegovog receptora CD98 u BAL-u trenutnih, ali i bivših pušača s KOPB-om, što ukazuje na trajni nedostatak unatoč prestanku pušenja. No, jednako je nađeno i u BAL-u zdravih pušača, što bi moglo biti barem djelomice uzrokom izloženosti cigaretnom dimu. Razlike u vrijednostima galektina-3 u epitelnim stanicama malih dišnih putova i BAL tekućini mogle bi biti objašnjene time da njegove uloge ovise upravo o unutarstaničnoj ili izvanstaničnoj lokalizaciji. U studiji je također potvrđeno da ekspresija galektina-3 utječe na reorganizaciju aktinskih niti te povećanje dostupnog unutarstaničnog glutationa (GSH) u makrofagima. Stoga je izgledno da niska razina galektina-3 i smanjena ekspresija CD98 koja će vjerojatno ugroziti razinu GSH, igra ulogu u neispravnoj eferocitozi bolesnika s KOPB-om.

Neučinkovitost alveolarnih makrofaga u ovoj bolesti očituje se i u poremećenoj autofagiji, unutarstaničnom sustavu razgradnje disfunkcionalnih citoplazmatskih sastojka poput pogrešno sintetiziranih ili oštećenih proteina, nefunkcionalnih organela ili unutarstaničnih patogena. Galektin-8 je protein adapter za autofagiju gdje nadzire endosomski i lizosomski integritet i služi kao receptor za oštećene vezikule, pokrećući selektivnu autofagijsku razgradnju vezanjem proteina NDP52. Najnovije istraživanje pokazalo je da i galektin-8 i NDP52 podliježu konstitutivnoj razgradnji autofagičnim mehanizmima čišćenja, odnosno da je izloženost makrofaga cigaretnom dimu dovela do nakupljanja unutarstaničnog galektina-8 i NDP52, potvrđujući utjecaj cigaretnog dima na povišene razine ovog proteina zabilježenih kod bolesnika s KOPB-om, i podržavajući pretpostavku da cigaretni dim inhibira sazrijevanje autofagosoma (Kono i sur., 2021).

#### 4.1.4. Antimikrobni peptidi

##### 4.1.4.1. LL-37

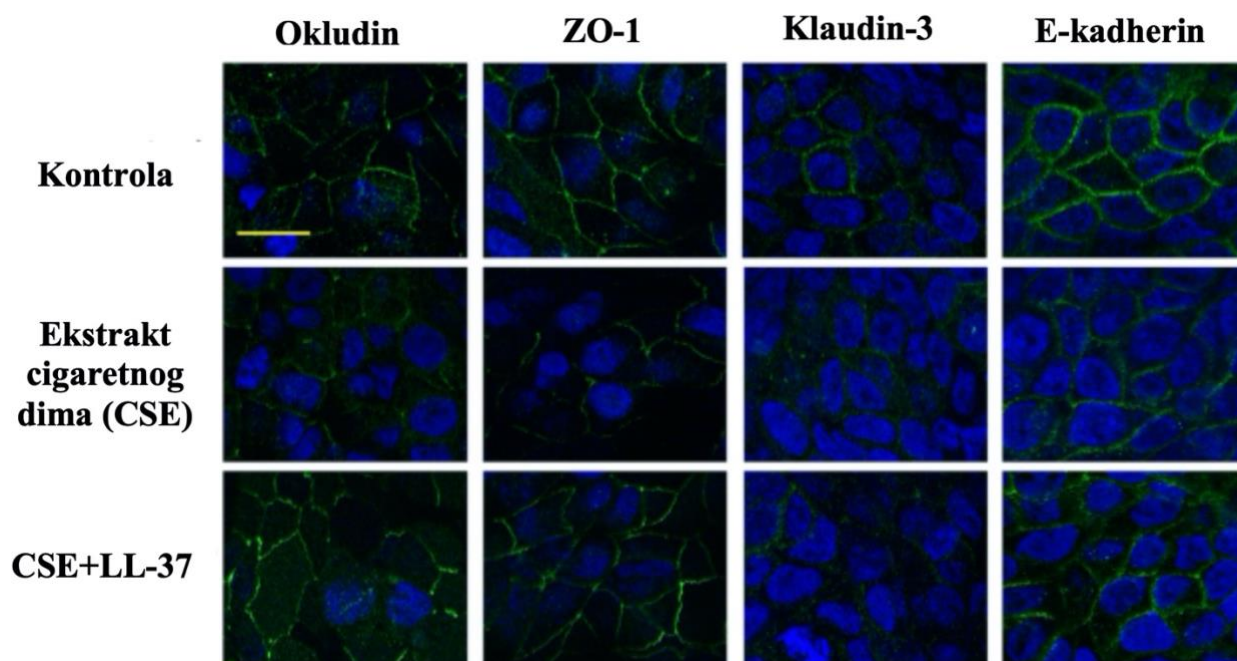
Jedini ljudski katelicidin nazvan je LL-37 / hCAP-18, a proizvode ga mijeloidne stanice, keratinociti, epitelne stanice, neutrofilni makrofagi i limfociti u dišnim putovima. Ekspresiju LL-37 u plućima pokreću patogeni i medijatori upale. LL-37 ima široko baktericidno djelovanje i na gram-pozitivne i na gram-negativne bakterije. Katelicidin ima funkciju DAMP molekule jer može izazvati proupalni odgovor vezanjem na TLR7, TLR9 i RAGE te izazvati nekrozu u epitelnim stanicama dišnih putova (Shaykhiev i sur., 2005).

Jiang i suradnici (2012) procijenili su ekspresiju LL-37 u serumu i induciranom sputumu bolesnika s KOPB-om, zdravih nepušača i zdravih pušača. Ekspresija LL-37 u sputumu tako je značajno veća kod bolesnika sa stadijem 1-2 i 3-4 u usporedbi sa zdravim nepušačima i zdravim pušačima, te negativno korelira s FEV<sub>1</sub> %, funkcionalnim kapacitetom (mjereno 6-minutnim testom hoda), a pozitivno s jačinom simptoma, što je procijenjeno upotrebom SGRQ upitnika (*st. George's respiratory Questionnaire*). U studiji su također pokazali da se ekspresija LL-37 postupno povećava nakon inkubacije epitelne stanice bronha i alveolarnih epitelne stanice s cigaretnim dimom tijekom 24 sata. U već spomenutoj studiji Huanga i suradnika (2019) LL-37 iz sputuma pokazao je visoku specifičnost i osjetljivost te bi mogao biti koristan biomarker za diferencijaciju astme i KOPB-a, budući da su nađene značajno povišene koncentracije LL-37 kod bolesnika s

KOPB-om i ACO sindromom, odnosno značajno snižene koncentracije LL-37 kod bolesnika s astmom u usporedbi sa zdravim pušačima (koncentracija LL-37 kod bolesnika s astmom nije se razlikovala od koncentracije mjerene kod zdravih nepušača). Kontradiktorno, u velikoj kohort studiji Burkesa i suradnika (2020) rezultati su pokazali nisku koncentraciju katelicidina u plazmi bolesnika s KOPB-om koja je povezana s trendom povećanja prijavljenih egzacerbacija u godini prije početka studije.

Rezultati istraživanja Sun i suradnici (2014) sugeriraju moguću ulogu LL-37 u remodeliranju malih dišnih putova u KOPB-u. Povećana ekspresija LL-37 nađena je u malim dišnim putovima pušača s KOPB-om u usporedbi s nepušačima i pušačima bez KOPB-a. Također, primijećeno je da su razine LL-37 u epitelu dišnih putova kod pušača više nego kod nepušača, što upućuje na to da dim cigareta može biti uzrokom povećane ekspresije LL-37, koja je u korelaciji s debljinom stijenke dišnih putova, kao i taloženjem kolagena u zidovima dišnih putova. *In vitro*, dim cigarete je povećao ekspresiju LL-37 u epitelnim stanicama bronha i posljedičnu proizvodnju kolagena u plućnim fibroblastima, što je potvrđeno nakon primjene LL-37 neutralizirajućeg protutijela.

S druge strane, jedno novije istraživanje (Tatsuta i sur., 2019) pokazalo je da bi LL-37 mogao imati protektivnu ulogu u zaštiti funkcije epitelne barijere dišnih putova od dima cigarete. Funkciju epitelne barijere održavaju apikalni spojni kompleksi koji nastaju između susjednih stanica i sastoje se od apikalnih uskih spojeva koji su ispod adherirajućih spojeva. Stanična linija humanih sub-bronhijalnih epitelnih stanica (HTB-55) prethodno je obrađena sa ili bez 10 (niskih) ili 20 (visokih)  $\mu\text{g} / \text{ml}$  LL-37 tijekom 2 sata, a zatim je izložena mediju s 10 %-tnim cigaretnim dimom koji je sadržavao LL-37. Funkcija barijere procijenjena je mjerenjem transepitelnog električnog otpora (eng. transepithelial electrical resistance, TEER) do 24 sata nakon stimulacije s cigaretnim dimom. Tretman visokom koncentracijom LL-37 u stanicama koje nisu tretirane cigaretnim dimom nije promijenio TEER u usporedbi s netretiranim kontrolnim stanicama. Nadalje, slabljenje smanjenja TEER-a izazvanog dimom cigarete pomoću LL-37 popraćeno je smanjenjem poremećaja okcludina i ZO-1 (zonula okcludens protein 1) procijenjenih imunofluorescentnom mikroskopijom (**Slika 4**). LL-37 također je umanjio cigaretnim dimom inducirano smanjenje razine ekspresije gena i proteina u okcludinu. Međutim, sam mehanizam zaštitnih učinaka LL-37 ostaje nepoznat.



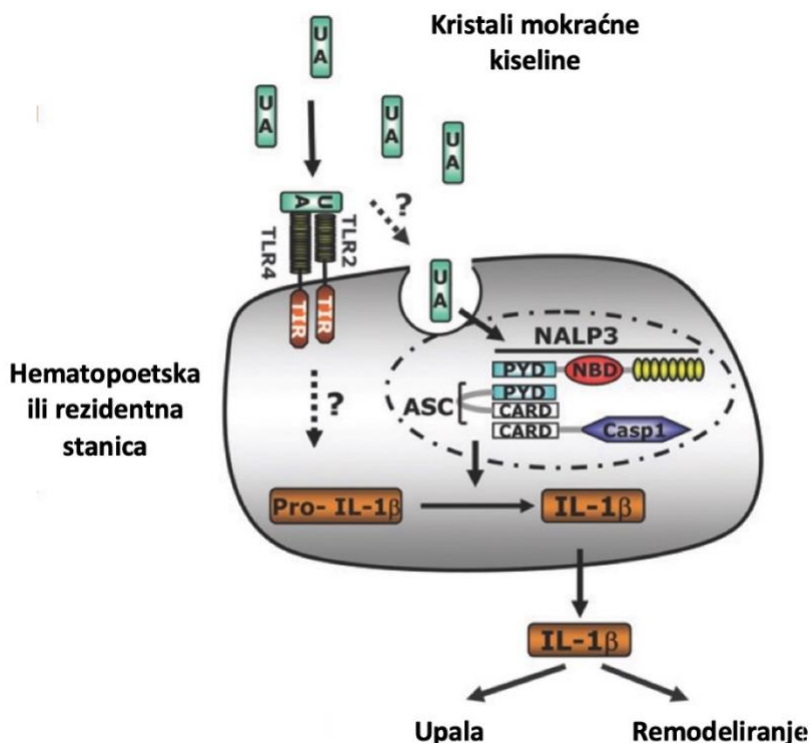
**Slika 4.** Učinci LL-37 na disrupciju proteina apikalnih uskih spojeva i adherirajućih spojeva s CSE-om dobiveni metodom imunofluorescencije (preuzeto iz Tatsuta i sur., 2019).

#### 4.1.5. Mokraćna kiselina

Mokraćna kiselina je mali, organski, heterociklički spoj koji se nalazi u jednostavnijim i složenijim organizmima. U ljudskom organizmu konačni je metabolit egzogenih, hranom unesenih, i endogenih, u organizmu sintetiziranih, purina. U većini vrsta mokraćna kiselina se može preraditi u visoko topljivi alantoin, čak i u amonijak. Giht kao stanje pojavio se u ljudi i drugih primata nakon evolucijskog gubitka urikaze, kataboličkog enzima mokraćne kiseline (uglavnom ograničenog na jetru) koji mokraćnu kiselinu pretvara u alantoinu kiselinu. Mokraćna kiselina se iz cirkulacije najvećim dijelom izlučuje mokraćom (tek manjim dijelom izlučuje se crijevom). Iz glomerularnog filtrata gotovo se sva mokraćna kiselina u proksimalnim tubulima reapsorbira, a urati u konačnoj mokraći potječu od aktivnog lučenja mokraćne kiseline u distalnim tubulima. Djeluje kao antioksidans i snažno sredstvo za uklanjanje peroksidnitrita (Ghaemi-Oskouie i Shi, 2011). Međutim, paradoksalno, osim antioksidacijskog korisnog učinka, mokraćna kiselina može imati prooksidacijska i proupalna svojstva. Pri visokoj lokalnoj koncentraciji mokraćna kiselina taloži se i stvara kristale koji uzrokuju upalu, kao što je uočeno kod kliničkog gihta. Još je ranije uočeno da ozljeda pluća rezultira lokalnim nakupljanjem mokraćne kiseline koja djeluje kao



endogena DAMP molekula, vjerojatno aktivirajući upalu putem NLRP3 i dovodeći do upale ovisne o IL-1 $\beta$  (Slika 5) (Gasse i sur., 2009).



**Slika 5.** Signalni putovi nakon izlaganja pluća egzogenim kristalima mokraćne kiseline (preuzeto iz Gasse i sur., 2009).

Postoje dokazi da mokraćna kiselina može aktivirati funkcije eozinofila u dišnim putovima poput degranulacije i proizvodnje citokina, pa su tako nađene povišene koncentracije mokraćne kiseline u BAL-u bolesnika s eozinofilnom pneumonijom, koje koreliraju s brojem eozinofila i koncentracijama neurotoksina podrijetlom iz eozinofila, IL-5 i kemokina eotaksina (Kobayashi i sur., 2017).

Cilj epidemiološke studije Fukuhare i suradnika (2017) bio je ispitati povezanost između opstrukcije protoka zraka u plućima i serumskih vrijednosti mokraćne kiseline (s-UA) te istražiti s-UA kao potencijalni pomoćni marker za predviđanje rizika od opstrukcije protoka zraka tijekom redovnog sistematskog pregleda. Budući da se tijekom takvih pregleda s-UA mjeri prilikom

probira na giht, u ovoj studiji su svi prikupljeni podaci iz godišnjeg sistematskog pregleda velikog broja ljudi korišteni retrospektivno. Ispitanici su kategorizirani prema statusu pušenja kao trenutni pušači, bivši pušači i nepušači koji nikada nisu konzumirali cigarete. Od ukupno 8662 muških i ženskih ispitanika starijih od 40 godina, njih 156 imalo je opstrukciju protoka zraka, od kojih je samo 29 % imalo respiratorne simptome (kašalj, ispljuvak ili dispneja). Broj trenutnih i bivših pušača s opstrukcijom iznosio je 65, odnosno 49. Pokazali su da ispitanici s bronhoopstrukcijom imaju više vrijednosti s-UA u usporedbi s nepušačima bez takve opstrukcije dišnih putova te da one značajno koreliraju s FEV<sub>1</sub> (% prediktivne vrijednosti). Osim toga, razine s-UA kod bivših i sadašnjih pušača bez opstrukcije također su bile više od onih u osoba koje nikada nisu pušile i nemaju utvrđenu opstrukciju protoka zraka.

Više koncentracije s-UA povezane su i s manjim funkcionalnim kapacitetom (određenim s 6-minutnim testom hoda) i većim brojem kardiovaskularnih komorbiditeta (Kahnert i sur., 2018). Osim toga, pokazalo se da su visoke razine mokraćne kiseline u serumu povezane s povećanom 30-dnevnom smrtnošću, kao i rizikom od akutnih egzacerbacija i hospitalizacija tijekom jednogodišnjeg praćenja (Bartziokas i sur., 2014).

Rezultati studije Rumore i sur. (2020) pokazali su povećanu koncentraciju mokraćne kiseline i njezinog omjera s kreatininom (eng. uric acid to creatinine ratio, UCR) u perifernoj krvi bolesnika s KOPB-om u usporedbi s dobno i spolom odgovarajućim zdravim ispitanicima. Također, opći upalni biljezi (broj leukocita, CRP) kao i citokin IL-1 $\beta$ , bili su povišeni kod bolesnika s KOPB-om, a pokazali su korelaciju s mokraćnom kiselinom i UCR-om. Kod bolesnika s KOPB-om mokraćna kiselina i UCR bili su povišeni u svim ispitivanim GOLD stadijima u usporedbi s kontrolama, čak i u GOLD 2 stadiju. No, nisu pronađene razlike u koncentracijama mokraćne kiseline između pojedinih stadija bolesti. Suprotno tome, vrijednosti UCR-a mogle su razlikovati stadij GOLD 3 od stadija GOLD 4. Kada su bolesnici s KOPB-om podijeljeni prema simptomima i povijesti egzacerbacija (ABCD procjena), utvrđena je povećana koncentracija mokraćne kiseline i UCR-a u skupinama GOLD B i GOLD D (skupine s lošijim simptomima), bez značajne razlike između bolesnika u skupini GOLD A i zdravih ispitanika. Opet, samo je UCR mogao razlikovati GOLD skupine (GOLD A i GOLD D, kao i GOLD B i GOLD D), zbog čega se ovdje pokazao boljim prediktorom od mokraćne kiseline u dijagnostici KOPB-a. Multiparametarski upalni modeli s UCR-om pokazali su bolja dijagnostička obilježja kada je uključen i citokin IL-1 $\beta$

(pravilno klasificirano 90 % slučajeva), u odnosu na jednostavniji model sa samo rutinskim laboratorijskim parametrima (broj leukocita, CRP, fibrinogen), koji je pravilno klasificirao 74 % slučajeva. Uzimajući u obzir status pušenja, pušači s KOPB-om pokazali su smanjene koncentracije mokraćne kiseline i UCR-a u usporedbi s nepušačima s KOPB-om i bivšim pušačima s KOPB-om, čije su vrijednosti bile slične onima iz skupine kontrolnih zdravih ispitanika.

Plućna hipoksija rezultira većim katabolizmom purina što dovodi do povećane proizvodnje mokraćne kiseline (Elsayed i sur., 1993). Osim toga, zabilježeno je da hipoksija može povećati gensku ekspresiju ksantin-oksidade (Hassoun i sur., 1998). Budući da je hipoksija sastavni dio patofiziologije KOPB-a, ovime bi se moglo objasniti povećane vrijednosti mokraćne kiseline mjerene u tjelesnim tekućinama bolesnika s KOPB-om.

Mokraćna kiselina kod ljudi najzastupljeniji je topljivi antioksidans koji čini do 60 % kapaciteta uklanjanja slobodnih radikala u serumu i važan je unutarstanični čistač slobodnih radikala tijekom metaboličkog stresa, uključujući i onog koji je posljedica pušenja, zbog čega se i niže koncentracije mokraćne kiseline u serumu kod pušača mogu objasniti smanjenom endogenom proizvodnjom kao rezultatom kronične izloženosti cigaretnom dimu koji je značajan izvor oksidacijskog stresa (Hanna i sur., 2008).

## **4.2. DAMP molekule podrijetlom iz staničnih organela**

### **4.2.1. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (eng. high-mobility group box 1, HMGB1)**

HMGB1 prvi je identificirani član obitelji HMGB, koja sadrži još i HMGB2 i HMGB3 članove. Struktura svih HMGB proteina vrlo je očuvana (više od 80 % sekvence). Među tri HMGB proteina, HMGB1 je najrasprostranjeniji nehistski nuklearni protein, a u određenoj je mjeri izražen i u citoplazmi, budući da prometuje iz jezgre i nazad. U jezgri podržava strukturu kromatina vezujući DNA na nespecifičan slijed i uključen je u regulaciju transkripcije gena. HMGB1 sadrži dvije domene HMG koje vežu DNA, nazvane A i B kutije, i kraj koji sadrži isključivo glutaminsku i asparaginsku kiselinu. Dva signala nuklearne lokalizacije (eng. nuclear localization signals, NLS), smještena u A polju, odnosno u B polju, usmjeravaju translokaciju proteina u jezgru (Yang i sur., 2013). Unutar stanice, HMGB1 je uključen u autofagiju i u aktivaciju protein kinaze R (PKR) / inflammasoma. Također se nalazi membranski iskprimiran na aktiviranim trombocitima i ranim

neuronima tijekom neuronalnog razvoja i regeneracije. Izvanstanični HMGB1 postao je posebno od interesa jer je uključen u razne imunosne reakcije, djelujući kao alarmin. Posttranslacijske modifikacije HMGB1 proteina određuju njegovu sudbinu na način da moduliraju njegovu kako lokalizaciju acetilacijom i / ili fosforilacijom, tako i njegove funkcije (kemoatraktant ili proupalni citokin) oksidacijom (Vénéreau i sur., 2016). Posttranslacijski redoks mehanizmi kontroliraju proupalnu aktivnost HMGB1 u patogenezi sepse, ali i drugih upalnih bolesti, kao što su sistemski eritemski lupus, artritis, epilepsija, kronična i neuropatska bol i druge, stoga ga brojne studije sugeriraju kao potencijalnu terapijsku metu u akutnim i kroničnim upalnim stanjima koja su karakterizirana oštećenjem tkiva i pregradnjom (Andersson i sur., 2018). Acetilacija lizinskih ostataka NLS-a presudna je za translokaciju proteina iz jezgre u citoplazmu i oslobađanje proteina imunskim stanicama (Vénéreau i sur., 2016).

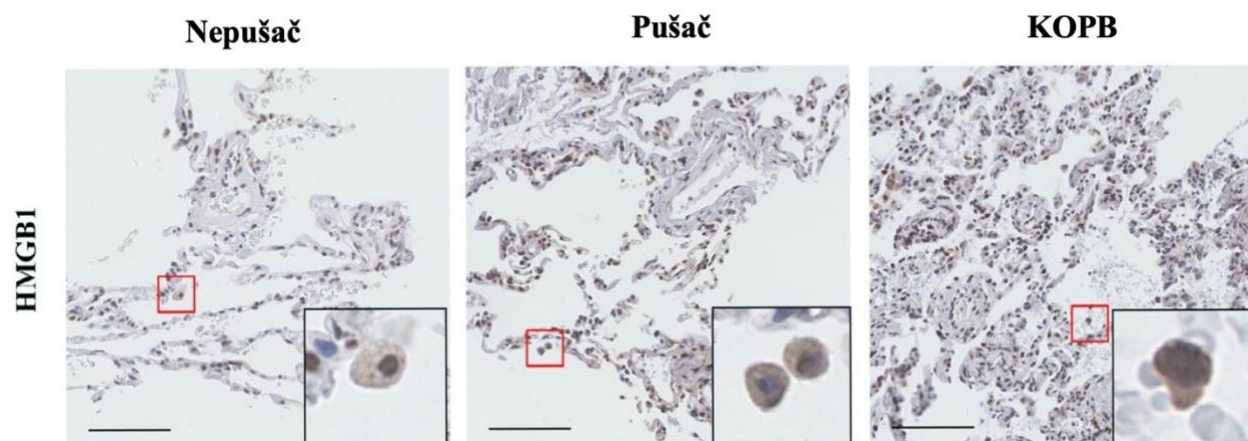
Način života utječe na izvanstaničnu sistemsku ekspresiju HMGB1, pa su tako brojne studije izvijestile da upravo dim cigarete koji uzrokuje nekrozu neutrofila s posljedičnim otpuštanjem HMGB1 u mikrookoliš (Heijink i sur., 2015) te da ima ulogu u patogenezi KOPB-a (Pouwels i sur. 2015). U istraživanju Chenga i suradnika (2017) na mišjem modelu, nakon izlaganja dimu cigarete (tijekom 3 dana), rezultati uzoraka plućnog tkiva i BAL tekućine pokazali su povećanu ekspresiju TLR4, pojačano signaliziranje s TLR4 receptorom u plućima i induciranu translokaciju HMGB1 iz jezgre u citoplazmu, nakon čega je uslijedilo njegovo izvanstanično oslobađanje. HMGB1 aktivira putove p38, JNK i NF- $\kappa$ B kroz signalne putove ovisne o TLR4 / MyD88 i inducira staničnu upalu i proizvodnju proupalnih citokina u plućima izloženim dimu cigarete.

Koncentracije HMGB1 iz BAL tekućine povišene su kod bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima i pušačima bez KOPB-a te pozitivno koreliraju s receptorom TNF-RII i IL-1 $\beta$ , a negativno s receptorom antagonista IL-1 (IL-1RA) (Ferhani i sur., 2010). Koncentracija HMGB1 mjerena u sputumu bolesnika s KOPB-om pokazala se u negativnoj korelaciji s parametrima plućne funkcije FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub> (% predviđene vrijednosti) i FEV<sub>1</sub> / FVC (Huang i sur. 2019). Ekspresija HMGB1 povećana je u submukoznim, epitelnim i alveolarnim stanicama kod pušača s KOPB-om. Niti jedan od ispitivanih parametara nije nađen povišen kod pušača bez KOPB-a i zdravih ispitanika (Ko i sur., 2014).

HMGB1 ima proliferativan učinak na stanice glatkih mišića i endotelne stanice plućnih arterija *in vitro*. Biopsija plućnog tkiva KOPB bolesnika s plućnom hipertenzijom i bolesnika s dijagnozom

idiopatske plućne arterijske hipertenzije otkrila je prisutnost stanica pozitivnih na HMGB1 koje okružuju preoblikovane žile (Zabini i sur., 2015).

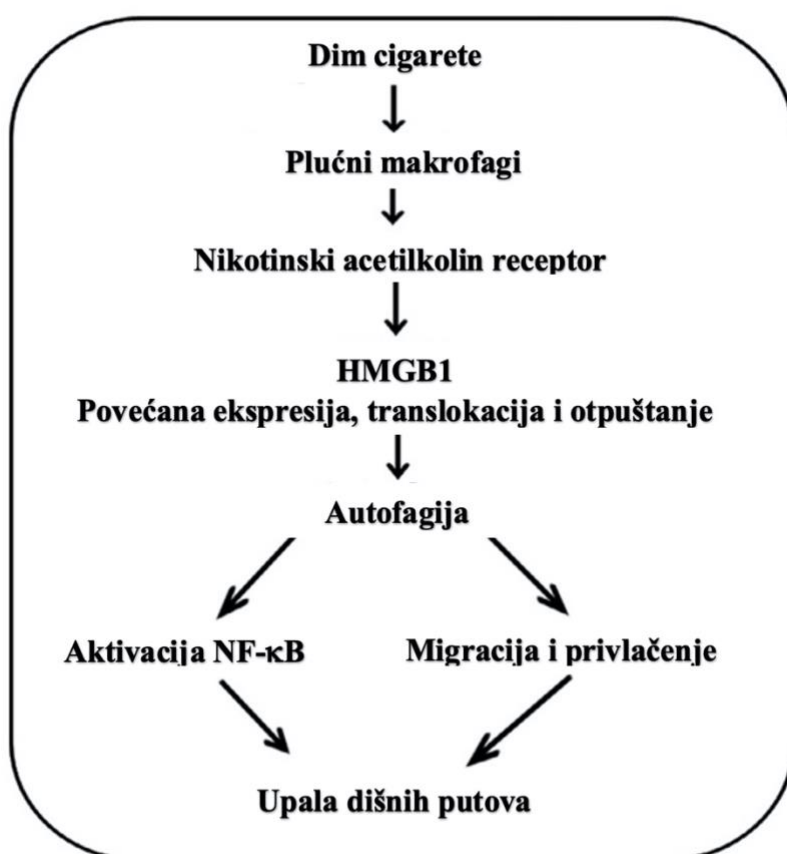
HMGB1 sudjeluje u patogenezi KOPB-a regulacijom autofagije alveolarnih makrofaga, što su u svojoj studiji pokazali Le i suradnici (2020). Rezultati su pokazali visoko eksprimiran HMGB1 u plućnim makrofagima bolesnika s KOPB-om. Za procjenu unutarstanične lokalizacije HMGB1 kod bolesnika s KOPB-om, pušača bez KOPB-a i nepušača bez KOPB-a, provedena je imunofluorescencija u plućnim tkivima ovih ispitanika koji su bili podvrgnuti resekciji pluća zbog indiciranih bolesti. Koncentracije HMGB1 u serumu pokazale su sličan trend, što upućuje na oslobađanje HMGB1. Nadalje, imunohistokemijom je pokazano da se u skupini nepušača HMGB1 nalazi gotovo isključivo u jezgrama makrofaga, dok je u skupinama bolesnika s KOPB-om i pušača otkriven i u citoplazmi i u jezgrama makrofaga (**Slika 6**).



**Slika 6.** Imunohistokemijska analiza reprezentativnog uzorka plućnog tkiva nepušača, pušača i bolesnika s KOPB-om s prikazom lokalizacije HMGB1 (preuzeto iz Le i sur., 2020).

Imunofluorescencija je također pokazala da je HMGB1 imao sličan obrazac unutarstanične lokalizacije i bio je lokaliziran s CD68, markerom ljudskih makrofaga. Ti su rezultati pokazali da je HMGB1 prošao kroz regulaciju i nukleocitoplazmatsku translokaciju u plućnim makrofagima kod bolesnika s KOPB-om. Ovi *in vivo* nalazi su potvrđeni na mišjem modelu dugotrajnim izlaganjem dimu cigarete. Dodatak inhibitora nAChR nikotinskog receptora (jako izražen u makrofagima i igra bitnu ulogu u imunomodulaciji makrofaga) u kulturu stanica plućnih makrofaga (MH-S stanična linija) smanjio je ekspresiju HMGB1 izazvanu CSE-om, čime su pokazali da je i nAChR uključen u nukleocitoplazmatsku translokaciju i oslobađanje HMGB1

izazvano CSE-om u plućima. Nadalje, pokazali su da CSE inducira migraciju plućnih makrofaga. Egzogeni rekombinantni humani HMGB1 (rhHMGB1) također je inducirao migraciju plućnih makrofaga, ali njegova sposobnost bila je slabija od CSE-a. Dodatak inhibitora spriječio je migraciju plućnih makrofaga izazvanu CSE-om blokirajući autofagiju, što je pokazalo da translokacija i oslobađanje HMGB1 inducirano CSE-om doprinose migraciji makrofaga indukcijom autofagije (Slika 7). Na kraju, u ispitivanju su pokazali da je aktivacija NF- $\kappa$ B signalnog puta djelovanjem cigaretnog dima u plućnim makrofagima posredovana putem HMGB1, te da translokacija i oslobađanje HMGB1 izazvano CSE-om doprinose aktivaciji NF- $\kappa$ B inducirajući autofagiju u plućnim makrofagima, promičući time transkripciju proupalnih citokina.

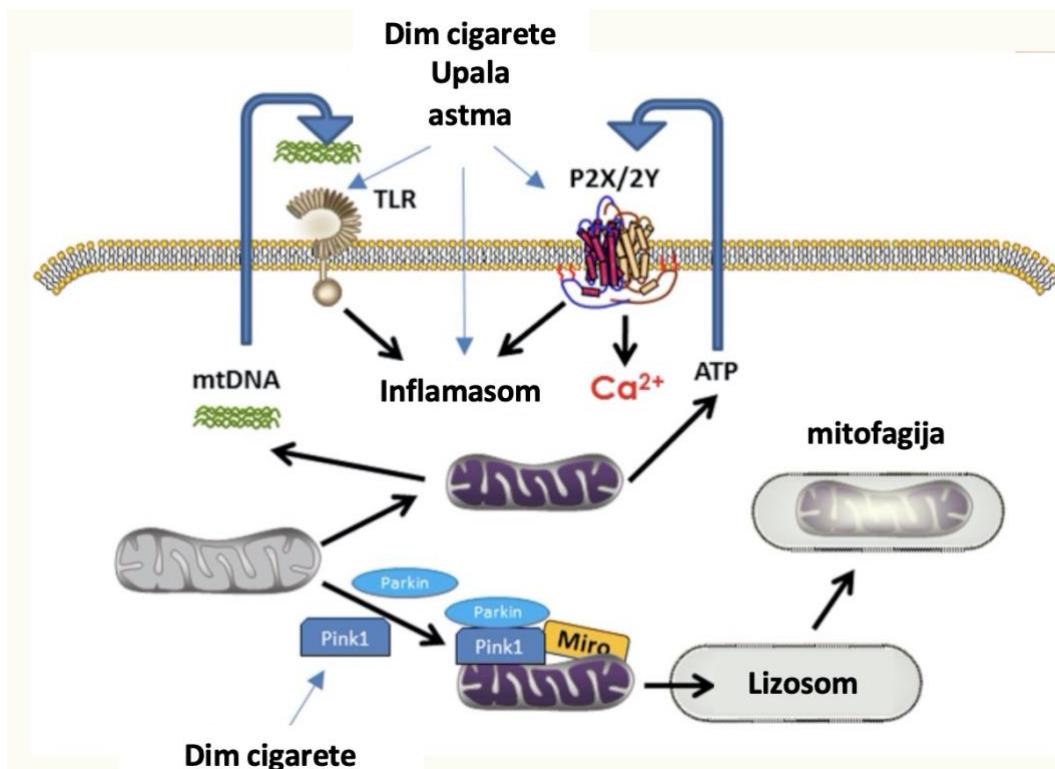


**Slika 7.** Mehanizam kojim translokacija i oslobađanje HMGB1 inducirani cigaretnim dimom, pridonose migraciji i aktivaciji NF- $\kappa$ B inducirajući autofagiju u makrofagima pluća (preuzeto iz Le i sur., 2020).

### 4.3. DAMP molekule podrijetlom iz mitohondrija

#### 4.3.1. Mitohondrijska DNA

Jedan od bioloških mehanizama koji može pružiti uvid u patogenezu i progresiju KOPB-a je disfunkcija mitohondrija. Pušenje duhana povezano je s oksidacijskim stresom i uzrokuje mitohondrijsku disfunkciju. Povećani ROS i oslabljena bioenergetika i / ili mitohondrijska biogeneza, mitofagija i dinamika, koji su presudni za održavanje homeostaze stanica, mogu rezultirati staničnom apoptozom i starenjem (Riou i sur., 2020). Ozljeda djelovanjem cigaretnog dima potiče uništavanje mitohondrija mehanizmom autofagije koji uključuju lizosome. Mitohondrijska disfunkcija također može rezultirati otpuštanjem fragmenata mitohondrijske DNA (mtDNA), koja ima autokrine / parakrine učinke, uključujući aktiviranje inflammasoma s posljedičnom upalom, proliferacijom stanica i apoptozom (**Slika 8**) (Prakash i sur., 2017).



**Slika 8.** Mitofagija DAMP molekule (preuzeto iz Prakash i sur., 2017).

Dim cigarete jedan je od uzroka „curenja“ mtDNA u izvanstanični prostor iz nekrotičnih neutrofila (Heijink i sur., 2015). Liu i suradnici (2015) pokazali su da je broj kopija mtDNA perifernih leukocita smanjen kod bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima, čime su u raspravi sugerirali manju zaštitu ili biosintezu mtDNA u tih bolesnika, odnosno da disfunkcija mitohondrija može rezultirati abnormalnom funkcijom leukocita kod bolesnika s KOPB-om. U ovom istraživanju broj kopija mtDNA bio je sličan kod zdravih pušača i nepušača. Također vrijednosti antioksidansa glutationa u serumu u skupini s KOPB-om bile su značajno smanjene u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima, a broj kopija mtDNA perifernih leukocita pokazao je značajnu linijsku korelaciju s glutationom u serumu.

U istraživanju Zhanga i sur. (2020) mjerena je izvanstanična mtDNA u mokraći (u-mtDNA), kao pokazatelj sistemskog oštećenja mitohondrija kod osoba s KOPB-om. Više vrijednosti u-mtDNA bile su povezane s lošijim rezultatima 6-minutnog testa hoda, SGRQ upitnika i CAT upitnika, a posebice kod pušača bez opstrukcije dišnih putova, što upućuje da bi patološki proces kod „zdravih“ ispitanika već mogao započeti. Ispitanici su bili zdravi nepušači, pušači bez opstrukcije dišnih putova, osobe s blagim / umjerenim KOPB-om i osobe s teškim KOPB-om. Koncentracije u-mtDNA razlikovale su se u odnosu na spol, s višim koncentracijama kod žena, i neovisno o statusu pušenja, budući da je trend opažen i kod nepušača. u-mtDNA korelirala je s ozbiljnošću respiratornih simptoma samo kod žena. Izvor u-mtDNA u studiji je ostao nepoznat; još uvijek nije jasno potječe li u-mtDNA iz bubrega, ili se filtrira i izlučuje (ili ne reapsorbira) iz cirkulacije. Također je potrebno utvrditi je li u-mtDNA u KOPB-u biljeg bolesti ili je sama po sebi patogena.

#### 4.3.2. Izvanstanični adenozin-5'-trifosfat (eATP)

ATP se oslobađa kao ko-prijenosnik iz svih vrsta živčanih završetaka, eritrocita, aktiviranih trombocita, naprežućih skeletnih mišića, ishemijskih i apoptotskih stanica, vaskularnih stanica glatkih mišića, endotelnih i epitelnih stanica. Izvanstanični ATP (eATP) je autokrini i parakrini posrednik. Njegovi učinci posredovani su P2 purinergičkim receptorima (P2R) na površini stanice, podijeljenima u dvije obitelji: transmembranske kationske kanale (P2XR) i sedam transmembranskih G proteinskih receptora P2YR. eATP igra važnu ulogu u plućnoj fiziologiji, kao što je transport natrija i vode u epitelu cilija te izlučivanje mucina, ali i u upali dišnih putova.



Postoje dokazi da je eATP uključen u oslobađanje MUC5AC mucina uglavnom putem P2Y2R na autokrini način tijekom egzacerbacije KOPB-a izazvane virusom te da dvolančana RNA virusnog podrijetla može inducirati oslobađanje ATP-a preko kanala paneksina (Shishikura i sur., 2016). Osim toga, ATP izaziva jaču dispneju, kašalj i iritaciju u grlu kod pušača i bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima (Basoglu i sur., 2015). Ekspresija P2R u svim stanicama pluća i sveprisutnost ATP-a čine ga idealnim izvanstaničnim glasnikom staničnog stresa, a aktivacija P2R na imunskim stanicama utječe na različite funkcije tih stanica, uključujući o imunoglobulinima E ovisno i s P2X7 posredovano oslobađanje histamina iz ljudskih mastocita pluća te staničnu kemotaksiju. P2Y6R je povezan s proupalnim oslobađanjem citokina u dendritičnim stanicama, eozinofilima, mastocitima, monocitima i neutrofilima. eATP brzo se razgrađuje u adenzin-5'-difosfat, adenzin-5'-monofosfat i adenzin pomoću ektoenzima (uglavnom CD39 i CD73). Analiza perifernog plućnog tkiva i interkostalnih arterija (reprezentativno sistemsko vaskularno tkivo) pokazuje smanjenu ekspresiju enzima koji razgrađuju ATP i enzima koji proizvode adenzin u plućima i interkostalnim arterijama KOPB bolesnika i pušača bez opstrukcije zraka u usporedbi sa zdravim nepušačima. S druge strane, ekspresija enzima koji stvaraju adenzin u istom slučaju povećana, što sugerira mehanizam kompenzacije koji postoji samo kod pušača (Careta i sur., 2019).

Iako brza degradacija eATP-a rezultira niskim koncentracijama eATP-a općenito, specifični mikrookolišni i patofiziološki uvjeti povezani su s povišenim lokalnim koncentracijama eATP-a (Pelleg i sur., 2016). Rumora i suradnici (2021) tako su pokazali da izvanstanični HSP70 i cigaretni dim dovode do oslobađanja ATP-a u bronhijalnim epitelnim stanicama i diferenciranim monocitima. Slično je potvrđeno i u uzorcima BAL tekućine, u studiji Lommatzscha i suradnika (2010) koja je mjerila koncentracije eATP-a kod bolesnika s KOPB-om u različitim stadijima bolesti, zdravih pušača i nepušača, nakon kroničnog i akutnog izlaganja cigaretnom dimu. Kronični pušači tako imaju povišene koncentracije eATP-a u BAL-u u usporedbi s nepušačima, s najvišim koncentracijama kod pušača i bivših pušača s KOPB-om. Osim toga koncentracije eATP-a u BAL-u pokazuju negativnu korelaciju s funkcijom pluća, a pozitivnu s brojem neutrofila u BAL tekućini. ATP je inducirao jače kemotaktično djelovanje i oslobađanje elastaze iz neutrofila kod pacijenata s KOPB-om u usporedbi s kontrolnim ispitanicima. Uz to, makrofagi dišnih putova pacijenata s KOPB-om reagirali su povećanim lučenjem proupalnih medijatora i čimbenika

razgradnje tkiva nakon stimulacije ATP-om. Ovi su nalazi popraćeni pojačanom ekspresijom specifičnih purinergičkih receptora u neutrofilima periferne krvi i makrofagima dišnih putova bolesnika s KOPB-om.

Hlapčić i suradnici (2019) po prvi put su ispitali koncentracije eATP-a u perifernoj krvi bolesnika s KOPB-om. Otkrili su da je koncentracija eATP-a značajno povećana u plazmi bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima. Kada su ispitanici (bolesnici s KOPB-om i zdravi ispitanici) podijeljeni prema statusu pušenja, utvrđeno je da je koncentracija eATP-a povišena kod zdravih pušača u usporedbi sa zdravim nepušačima. Štoviše, eATP je bio povećan u cijeloj skupini bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima. Međutim, kada su se unutar skupine bolesnika s KOPB-om usporedile izmjerene vrijednosti eATP s obzirom na status pušenja, nije primijećena značajna razlika. Kako bi istražili utjecaj težine opstrukcije protoka zraka, simptoma i egzacerbacija na vrijednosti eATP-a u perifernoj krvi, bolesnici su klasificirani prema GOLD-u (stupanj 2, 3 i 4; nijedan pacijent nije ispunjavao uvjete za GOLD 1 stupanj). Rezultati su pokazali da se koncentracija eATP-a značajno povećava sa stupnjem ograničenja protoka zraka. Bolesnici sa stupnjem 3 i 4 imali su veću koncentraciju eATP-a u usporedbi s kontrolnim nepušačima i kontrolnim pušačima. Međutim, razlika nije primijećena između zdravih pušača i pacijenata s GOLD 2 stupnjem. Slični rezultati primijećeni su kada su procijenjeni simptomi i povijest egzacerbacija (GOLD A, B i D skupina; nijedan bolesnik nije ispunjavao uvjete za skupinu C). Tri skupine međusobno su se značajno razlikovale, a eATP se povećavao s težinom simptoma. Također, koncentracija eATP-a je povećana u skupinama bolesnika GOLD B i D u usporedbi s kontrolnim nepušačima i pušačima, ali ne pokazujući nikakvu razliku između zdravih pušača i bolesnika u GOLD A skupini. Izmjerena ekspresija mRNA dva receptora za eATP u krvi pokazala je slične vrijednosti kod kontrolnih ispitanika i bolesnika s KOPB-om za P2X7R, dok je ekspresija mRNA za P2Y2R pokazala dvostruko veću ekspresiju u bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim osobama. Ekspresija mRNA za P2Y2R nije se razlikovala između nepušača s KOPB-om i zdravih pušača.

Određene studije pronašle su povezanost između KOPB-a i ekspresije ektoenzima CD39. Međutim, pojedini nalazi su oprečni, pa su tako Lazar i suradnici (2016) u svojoj studiji pokazali znatno povišenu ekspresiju i aktivnost CD39 u leukocitima iz BAL-a osoba s dijagnozom KOPB-

a, u usporedbi s kontrolnim pušačima i nepušačima. Suprotno tome, Aliagas i suradnici (2018) zabilježili znatno sniženu ekspresiju gena CD39 u plućima bolesnika s KOPB-om u usporedbi s pušačima i nepušačima, koja je korelirala s većom sistemskom upalom i zadebljanjem intime mišićnih plućnih arterija u skupini bolesnika s KOPB-om. Uz to, kvantifikacija aktivnosti ATPaze je pokazala značajno nižu aktivnost također u skupini s KOPB-om. Ovi rezultati bi mogli objasniti prethodno prikazano povećanje koncentracije eATP-a u plućima bolesnika s KOPB-om i povećan upalni odgovor koji pogoduje razvoju emfizema. U raspravi su iznijeli kako se ovi naizgled kontradiktorni nalazi mogu objasniti razlikom u lokalizaciji CD39 u plućnom tkivu i upalnim stanicama. Budući da je aktivnost CD39 u odjeljcima tkiva smanjena bilo zbog oksidacijskog stresa ili proupalnih citokina, povećana ekspresija CD39 u leukocitima mogla bi nadoknaditi slabu ekspresiju CD39 u plućima i boriti se protiv upale u KOPB-u, odnosno biti kompenzacijski mehanizam za akutno izlaganje duhanu ili u infekciji.

## 5. ZAKLJUČCI

- KOPB jedan je od vodećih uzroka smrtnosti u cijelome svijetu. U podlozi patogeneze je kronična upala koja uzrokuje strukturne abnormalnosti na razini dišnih putova. Pušenje cigareta je glavni čimbenik rizika za razvoj KOPB-a. Dim cigarete izaziva sterilnu ozljedu epitelnih stanica dišnih putova, s posljedičnom apoptozom/nekrotozom i naknadnim oslobađanjem molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva (DAMP) koji imaju imunomodulatornu funkciju izvan stanice te aktiviraju druge upalne stanice. Postoje dokazi koji ukazuju na razlike u upalnom procesu u plućima pušača s KOPB-om i zdravih pušača/nepušača.
- Koncentracije pojedinih DAMP molekula u tjelesnim tekućinama bolesnika s KOPB-om razlikuju se od vrijednosti istih kod zdravih pušača i/ili nepušača.
- Koncentracija HSP27 mjerena u serumu bolesnika s KOPB-om, kao i koncentracija HSP70 u plazmi, značajno je viša u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima. Među bolesnicima sa stabilnim KOPB-om, povećavanje koncentracije HSP70 u plazmi može razlikovati skupine bolesnika po težini bolesti (s obzirom na GOLD stadije te GOLD ABCD klasifikaciju).
- S100A8 mjeren u sputumu pokazao se potencijalnim diferencijalnim biomarkerom KOPB-a i ACO-a. Koncentracije S100A9 nađene su značajno povišene u uzorcima BAL-a bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima, dok serumske koncentracije kalprotektina negativno koreliraju s plućnom funkcijom, a pozitivno s vrijednostima plinova u arterijskoj krvi i upalnim citokinima kod bolesnika s akutnim egzacerbacijama u usporedbi sa zdravim ispitanicima.
- Razina galektina-3 u serumu raste u fazi akutnog pogoršanja u usporedbi s fazom oporavka kod KOPB-a te pokazuje pozitivnu korelaciju sa serumskim koncentracijama biomarkera za procjenu egzacerbacije KOPB-a, hsCRP-om i pro-BNP-om. Suprotno tome, smanjene koncentracije galektina-3 nađene su u BAL-u trenutnih, ali i bivših pušača s KOPB-om.
- Ekspresija LL-37 u sputumu značajno je veća kod bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima i zdravim pušačima, te negativno korelira s FEV<sub>1</sub> %, funkcionalnim kapacitetom, a pozitivno s jačinom simptoma. LL-37 iz sputuma također se pokazao potencijalnim biomarkerom za diferencijaciju astme i KOPB-a.

- Ispitanici s bronhoopstrukcijom pokazuju više vrijednosti mokraćne kiseline u serumu u usporedbi s nepušačima bez bronhoopstrukcije, koje koreliraju s FEV<sub>1</sub>. Koncentracija mokraćne kiseline i njezin omjer s kreatininom (UCR) povećani su u perifernoj krvi bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima, te je nađena korelacija između koncentracija i općih upalnih biljega. Vrijednosti UCR-a mogu razlikovati pojedine GOLD stadije te skupine po ABCD klasifikaciji. Pušači s KOPB-om pokazali su smanjene koncentracije mokraćne kiseline i UCR-a u usporedbi s nepušačima s KOPB-om i bivšim pušačima s KOPB-om.
- Koncentracije HMGB1 iz BAL tekućine povišene su kod bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima i pušačima bez KOPB-a, a koncentracija HMGB1 mjerena u sputumu bolesnika s KOPB-om pokazala je negativnu korelaciju s parametrima plućne funkcije.
- Broj kopija mtDNA perifernih leukocita smanjen je kod bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima i pušačima. Suprotno tome, u mokraći su nađene više vrijednosti izvanstanične mtDNA, koje su povezane s lošijim rezultatima 6-minutnog testa hoda i upitnika za procjenu težine KOPB-a.
- Kod pušača i bivših pušača s KOPB-om u BAL tekućini nađene su povišene koncentracije eATP-a u odnosu na nepušače, koje pokazuju negativnu korelaciju s funkcijom pluća, a pozitivnu s brojem neutrofila u BAL-u. Koncentracija eATP-a značajno je povećana i u plazmi bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima, gdje je pokazala pozitivnu korelaciju sa stupnjem bronhoopstrukcije te je mogla razlikovati bolesnike prema težini simptoma (A, B i D skupina).
- Različiti profili DAMP molekula kod bolesnika s KOPB-om, zdravih pušača, nepušača, astmatičara i bolesnika s ACO-om kao i različiti patološki procesi ovih molekula, mogli bi omogućiti preciznije razlikovanje između pacijenata s različitim ishodima i odgovorom na terapiju. Iako je trenutno znanje o reproducibilnosti još uvijek nepotpuno i ove biomarkere tek treba validirati, postoji velika potreba za odobravanjem biomarkera KOPB-a kako bi se kliničarima omogućilo postizanje cjelovite i pravovremene procjene bolesnika. Izgledno je da će takav integrativni pristup koji kombinira biomarkere s kliničkim parametrima poboljšati sposobnost kliničara kako u postavljanju dijagnoze, tako i u praćenju progresije KOPB-a te predviđanju odgovora na terapiju.

## 6. LITERATURA

Akata K, van Eeden SF. Lung Macrophage Functional Properties in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 853.

Akata K, Yamasaki K, Leitao Filho FS, Yang CX, Takiguchi H, Sahin B, Whalen BA, Yang CWT, Leung JM, Sin DD, van Eeden SF. Abundance of Non-Polarized Lung Macrophages with Poor Phagocytic Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Biomedicines*, 2020, 8, 398.

Aliagas E, Muñoz-Esquerre M, Cuevas E, Careta O, Huertas D, López-Sánchez M, Escobar I, Dorca J, Santos S. Is the purinergic pathway involved in the pathology of COPD? Decreased lung CD39 expression at initial stages of COPD. *Respir Res*, 2018, 19, 103.

Andersson U, Yang H, Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22, 263-277.

Asea A. Heat Shock Proteins and Toll-Like Receptors. U: Toll-Like Receptors (TLRs) and Innate Immunity. Handbook of Experimental Pharmacology 183. Bauer S, Hartmann G, Uredneci, Berlin, Heidelberg, Springer, 2008, str. 111-127.

Barnes PJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Chest Med*, 2014, 35, 71–86.

Bartziokas K, Papaioannou AI, Loukides S, Papadopoulos A, Haniotou A, Papiris S, Kostikas K. Serum uric acid as a predictor of mortality and future exacerbations of COPD. *Eur Respir J*, 2014, 43, 43-53.

Basoglu OK, Barnes PJ, Kharitonov SA, Pelleg A. Effects of Aerosolized Adenosine 5'-Triphosphate in Smokers and Patients With COPD. *Chest*, 2015, 148, 430-435.

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, 2006, 81, 1–5.

Bolhassani A, Agi E. Heat shock proteins in infection. *Clin Chim Acta*, 2019, 498, 90–100.

Brajer-Luftmann B, Nowicka A, Kaczmarek M, Wyrzykiewicz M, Yasar S, Piorunek T, Sikora J, Batura-Gabryel H. Damage-Associated Molecular Patterns and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *J Immunol Res*, 2019b, 1–9.

Brajer-Luftmann B, Nowicka A, Kaczmarek M, Wyrzykiewicz M, Yasar S, Piorunek T, Grabicki M, Kostrzevska M, Sikora J, Batura-Gabryel H. Molecules of Damage-Associated Patterns in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Serum in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Adv Exp Med and Biol*, 2019a, 1113, 27-35.

Burkes RM, Ceppe AS, Couper DJ, Comellas AP, Wells JM, Peters SP, Criner GJ, Kanner RE, Paine R 3rd, Christenson SA, Cooper CB, Barjaktarevic IZ, Krishnan JA, Labaki WW, Han MK, Curtis JL, Hansel NN, Wise RA, Drummond MB; SPIROMICS collaborators. Plasma Cathelicidin is Independently Associated with Reduced Lung Function in COPD: Analysis of the Subpopulations and Intermediate Outcome Measures in COPD Study Cohort. *Chronic Obstr Pulm Dis*, 2020, 7, 370-381.

Careta O, Cuevas E, Muñoz-Esquerre M, López-Sánchez M, Pascual-González Y, Dorca J, Aliagas E, Santos S. Imbalance in the Expression of Genes Associated with Purinergic Signalling in the Lung and Systemic Arteries of COPD Patients. *Scientific Reports*, 2019, 9, 2796.

Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10, 826–837.

Chen L, Wang T, Guo L, Shen Y, Yang T, Wan C, Liao Z, Xu D, Wen F. Overexpression of RAGE contributes to cigarette smoke-induced nitric oxide generation in COPD. *Lung*, 2014, 192, 267-75.

Cheng Y, Wang D, Wang B, Li H, Xiong J, Xu S, Chen Q, Tao K, Yang X, Zhu Y, He S. HMGB1 translocation and release mediate cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice through a TLR4/MyD88-dependent signaling pathway. *Mol Biol Cell*, 2017, 28, 201-209.

Churg A, Zhou S, Wang X, Wang R, Wright JL. The Role of Interleukin-1b in Murine Cigarette Smoke-Induced Emphysema and Small Airway Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 40, 482-90.

Colarusso C, Terlizzi M, Molino A, Pinto A, Sorrentino R. Role of the inflammasome in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Oncotarget*, 2017, 8, 81813-81824.

Cosío BG, Dacal D, Pérez de Llano L. Asthma–COPD overlap: identification and optimal treatment. *Ther Adv Respir Dis*, 2018.

Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 Proteins. *Curr Mol Med*, 2013, 13, 24-57.

Dong J, Guo L, Liao Z, Zhang M, Zhang M, Wang T, Chen L, Xu D, Feng Y, Wen F. Increased expression of heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17, 885-93.

Elsayed NM, Nakashima JM, Postlethwait EM. Measurement of Uric Acid as a Marker of Oxygen Tension in the Lung. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 302, 228–232.

Feng W, Wu X, Li S, Zhai C, Wang J, Shi W, Li M. Association of Serum Galectin-3 with the Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Med Sci Monit*, 2017, 23, 4612-4618.

Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, Thibaudeau O, Grandsaigne M, Maret M, Dombret MC, Sims GP, Kolbeck R, Coyle AJ, Aubier M, Pretolani M. Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181, 917-27.

Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, Suffredini AF. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*, 2003, 101, 2652-2660.

Fukuhara A, Saito J, Sato S, Saito K, Fukuhara N, Tanino Y, Wang X, Rinno K, Suzuki H, Munakata M. The association between risk of airflow limitation and serum uric acid measured at medical health check-ups. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12, 1213-1219.



Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Pétrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. Uric Acid Is a Danger Signal Activating NALP3 Inflammasome in Lung Injury Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179, 903-13.

Ghaemi-Oskouie F, Shi Y. The Role of Uric Acid as an Endogenous Danger Signal in Immunity and Inflammation. *Curr Rheumatol Rep*, 2011, 13, 160-166.

Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest. Globalna strategija za dijagnozu, liječenje i prevenciju kronične opstruktivne plućne bolesti 2020., <https://goldcopd.org>, pristupljeno 16. 4. 2020.

Gogebakan B, Bayraktar R, Ulaslı M, Oztuzcu S, Tasdemir D, Bayram H. The role of bronchial epithelial cell apoptosis in the pathogenesis of COPD. *Mol Biol Rep*, 2014, 41, 5321-5327.

Gonzalez LL, Garrie K, Turner MD. Role of S100 proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867.

Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreis A, Aigner C, Lichtenauer M, Mangold A, Niederpold T, Zimmermann M, Taghavi S, Klepetko W, Ankersmit HJ. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 $\alpha$  in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. *Clin Lab*, 2009, 55, 31-40.

Hanna BE, Hamed JM, Touhala LM. Serum uric acid in smokers. *Oman Med J*, 2008, 23, 269-274.

Hassoun PM, Yu FS, Cote CG, Zulueta JJ, Sawhney R, Skinner KA, Skinner HB, Parks DA, Lanzillo JJ. Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158, 299-305.

Heijink IH, Pouwels SD, Leijendekker C, de Bruin HG, Zijlstra GJ, van der Vaart H, ten Hacken NH, van Oosterhout AJ, Nawijn MC, van der Toorn M. Cigarette smoke-induced damage-associated molecular pattern release from necrotic neutrophils triggers proinflammatory mediator release. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 52, 554-62.

Heil M, Land WG. Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life. *Front Plant Sci*, 2014, 5, 578.

Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N, Chung YM, Chow S, Herbert C, Geczy CL. S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury. *J Immunol*, 2014, 192, 2800-2811.

Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N, Wong SW, Chow S, Kawaguchi N, Geczy CL. S100A8/A9 and S100A9 reduce acute lung injury. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95, 461-472.

Hlapčić I, Hulina-Tomašković A, Somborac-Baćura A, Rajković MG, Dugac AV, Popović-Grle S, Rumora L. Extracellular adenosine triphosphate is associated with airflow limitation severity and symptoms burden in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep*, 2019, 9, 15349.

Hlapčić I, Hulina-Tomašković A, Grdić Rajković M, Popović-Grle S, Vukić Dugac A, Rumora L. Association of Plasma Heat Shock Protein 70 with Disease Severity, Smoking and Lung Function of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Med*, 2020, 9, 3097.

Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37, 748-755.

Hodge S, Matthews G, Mukaro V, Ahern J, Shivam A, Hodge G, Holmes M, Jersmann H, Reynolds PN. Cigarette Smoke-induced Changes to Alveolar Macrophage Phenotype and Function is Improved by Treatment with Procysteine. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44, 673-681.

Huang SJ, Ding ZN, Xiang HX, Fu L, Fei J. Association Between Serum S100A8/S100A9 Heterodimer and Pulmonary Function in Patients with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lung*, 2020, 198, 645-652.

Huang X, Tan X, Liang Y, Hou C, Qu D, Li M, Huang Q. Differential DAMP release was observed in the sputum of COPD, asthma and asthma-COPD overlap (ACO) patients. *Sci Rep*, 2019, 9, 19241.

Hulina-Tomašković A, Heijink IH, Jonker MR, Somborac-Baćura A, Grdić Rajković M, Rumora L. Pro-inflammatory effects of extracellular Hsp70 and cigarette smoke in primary airway epithelial cells from COPD patients. *Biochimie*, 2019a, 156, 47-58.

Hulina-Tomašković A, Somborac-Baćura A, Grdić Rajković M, Bosnar M, Samaržija M, Rumora L. Effects of extracellular Hsp70 and cigarette smoke on differentiated THP-1 T cells and human monocyte-derived macrophages. *Mol Immunol*, 2019b, 111, 53-63.

Jiang YY, Xiao W, Zhu MX, Yang ZH, Pan XJ, Zhang Y, Sun CC, Xing Y. The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2012, 106, 1680-1689.

Kahnert K, Alter P, Welte T, Huber RM, Behr J, Biertz F, Watz H, Bals R, Vogelmeier CF, Jörres RA. Uric acid, lung function, physical capacity and exacerbation frequency in patients with COPD: a multi-dimensional approach. *Respir Res*, 2018, 19, 110.

Kaul G, Thippeswamy H. Role of Heat Shock Proteins in Diseases and Their Therapeutic Potential. *Indian J Microbiol*, 2011, 51, 124-131.

Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative Stress in COPD. *Chest*, 2013, 144, 266-273.

Ko HK, Hsu WH, Hsieh CC, Lien TC, Lee TS, Kou YR. High expression of high-mobility group box 1 in the blood and lungs is associated with the development of chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Respirology*, 2014, 19, 253-261.

Kobayashi T, Nakagome K, Noguchi T, Kobayashi K, Ueda Y, Soma T, Ikebuchi K, Nakamoto H, Nagata M. Elevated uric acid and adenosine triphosphate concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of eosinophilic pneumonia. *Allergol Int*, 2017, 66, 27-34.

Kono Y, Colley T, To M, Papaioannou AI, Mercado N, Baker JR, To Y, Abe S, Haruki K, Ito K, Barnes PJ. Cigarette smoke-induced impairment of autophagy in macrophages increases galectin-8 and inflammation. *Sci Rep*, 2021, 11, 335.

Lazar Z, Müllner N, Lucattelli M, Ayata CK, Cicko S, Yegutkin GG, De Cunto G, Müller T, Meyer A, Hossfeld M, Sorichter S, Horvath I, Virchow CJ, Robson SC, Lungarella G, Idzko M.

NTPDase1/CD39 and aberrant purinergic signalling in the pathogenesis of COPD. *Eur Respir J*, 2016, 47, 254-63.

Le Y, Wang Y, Zhou L, Xiong J, Tian J, Yang X, Gai X, Sun Y. Cigarette smoke-induced HMGB1 translocation and release contribute to migration and NF- $\kappa$ B activation through inducing autophagy in lung macrophages. *J Cell Mol Med*, 2020, 24, 1319-1331.

Li M, Guo L, Wang H, Wang T, Shen Y, Liao Z, Wen F, Chen L. RAGE-ligands axis: A new 'driving force' for cigarette smoke-induced airway inflammation in COPD? *Respirology*, 2015, 20, 998-999.

Lin CR, Bahmed K, Criner GJ, Marchetti N, Tudor RM, Kelsen S, Bolla S, Mandapati C, Kosmider B. S100A8 protects human primary alveolar type II cells against injury and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2019, 60, 299-307.

Liu SF, Kuo HC, Tseng CW, Huang HT, Chen YC, Tseng CC, Lin MC. Leukocyte mitochondrial DNA copy number is associated with chronic obstructive pulmonary disease, 2015, 10.

Lommatzsch M, Cicko S, Müller T, Lucattelli M, Bratke K, Stoll P, Grimm M, Dürk T, Zissel G, Ferrari D, Di Virgilio F, Sorichter S, Lungarella G, Virchow JC, Idzko M. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181, 928-934.

McCubbrey AL, Curtis JL. Efferocytosis and Lung Disease. *Chest*, 2013, 143, 1750-1757.

Mercado N, Ito K, Barnes PJ. Accelerated ageing of the lung in COPD: New concepts. *Thorax*, 2015, 70, 482-489.

Milani A, Basirnejad M, Bolhassani A. Heat-shock proteins in diagnosis and treatment: an overview of different biochemical and immunological functions. *Immunotherapy*, 2019, 11, 215-239.

Miravitlles M, Ribera A. Understanding the impact of symptoms on the burden of COPD. *Respir Res*, 2017, 18, 67.

Mukaro VR, Bylund J, Hodge G, Holmes M, Jersmann H, Reynolds PN, Hodge S. Lectins Offer New Perspectives in the Development of Macrophage-Targeted Therapies for COPD/Emphysema. *PLoS One*, 2013, 8.

Multhoff G. Heat Shock Proteins in Immunity. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, 172, 279-304.

Negewo NA, Gibson PG, McDonald VM. COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. *Respirology*, 2015, 20, 1160-1171.

Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2018, 18, 63.

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

Pelleg A, Schulman ES, Barnes PJ. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Obstructive Airway Diseases. *Chest*, 2016, 150, 908-915.

Pirozzi C, Scholand MB. Smoking Cessation and Environmental Hygiene. *Med Clin North Am*, 2012, 96, 849-867.

Pouwels SD, Heijink IH, ten Hacken NH, Vandenabeele P, Krysko DV, Nawijn MC, van Oosterhout AJ. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal Immunol*, 2014, 7, 215-226.

Pouwels SD, Hesse L, Faiz A, Lubbers J, Bodha PK, Ten Hacken NH, van Oosterhout AJ, Nawijn MC, Heijink IH. Susceptibility for cigarette smoke-induced DAMP release and DAMP-induced inflammation in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016b, 311, 881-892.

Pouwels SD, Nawijn MC, Bathoorn E, Riezebos-Brilman A, van Oosterhout AJ, Kerstjens HA, Heijink IH. Increased serum levels of LL37, HMGB1 and S100A9 during exacerbation in COPD patients. *Eur Respir J*, 2015, 45, 1482-1485.

Pouwels SD, Zijlstra GJ, van der Toorn M, Hesse L, Gras R, Ten Hacken NH, Krysko DV, Vandenabeele P, de Vries M, van Oosterhout AJ, Heijink IH, Nawijn MC. Cigarette smoke-

induced necroptosis and DAMP release trigger neutrophilic airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016a, 310, 377-386.

Prakash YS, Pabelick CM, Sieck GC. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*, 2017, 152, 618-626.

Railwah C, Lora A, Zahid K, Goldenberg H, Campos M, Wyman A, Jundi B, Ploszaj M, Rivas M, Dabo A, Majka SM, Foronjy R, El Gazzar M, Geraghty P. Cigarette smoke induction of S100A9 contributes to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 319, 1021-1035.

Reimann S, Fink L, Wilhelm J, Hoffmann J, Bednorz M, Seimetz M, Dessureault I, Troesser R, Ghanim B, Klepetko W, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. Increased S100A4 expression in the vasculature of human COPD lungs and murine model of smoke-induced emphysema. *Respir Res*, 2015, 16, 127.

Riou M, Alfatni A, Charles AL, Andrès E, Pistea C, Charloux A, Geny B. New Insights into the Implication of Mitochondrial Dysfunction in Tissue, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Platelets during Lung Diseases. *J Clin Med*, 2020, 9, 1253.

Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*, 2018, 18.

Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22, 416-425.

Rumora L, Hlapčić I, Hulina-Tomašković A, Somborac-Baćura A, Bosnar M, Rajković MG. Pathogen-associated molecular patterns and extracellular Hsp70 interplay in NLRP3 inflammasome activation in monocytic and bronchial epithelial cellular models of COPD exacerbations. *APMIS*, 2021, 129, 80-90.

Rumora L, Hlapčić I, Popović-Grle S, Rako I, Rogić D, Čepelak I. Uric acid and uric acid to creatinine ratio in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease: Potential biomarkers in multicomponent models comprising IL-1beta. *PLoS One*, 2020, 15.

Shabani F, Farasat A, Mahdavi M, Gheibi N. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. *Inflamm Res*, 2018, 67, 801-812.

Shishikura Y, Koarai A, Aizawa H, Yamaya M, Sugiura H, Watanabe M, Hashimoto Y, Numakura T, Makiguti T, Abe K, Yamada M, Kikuchi T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M. Extracellular ATP is involved in dsRNA-induced MUC5AC production via P2Y2R in human airway epithelium. *Respir Res*, 2016, 17, 121.

Simard JC, Girard D, Tessier PA. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*, 2010, 87, 905-914.

Somborac-Baćura A, Rumora L, Novak R, Rašić D, Dumić J, Čepelak I, Žanić-Grubišić T. Differential expression of heat shock proteins and activation of mitogen-activated protein kinases in A549 alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Exp Physiol*, 2018, 103, 1666-1678.

Srivastava PK. New Jobs for ancient chaperones. *Sci Am*, 2008, 299, 50-55.

Sun C, Zhu M, Yang Z, Pan X, Zhang Y, Wang Q, Xiao W. LL-37 secreted by epithelium promotes fibroblast collagen production: a potential mechanism of small airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Lab Invest*, 2014, 94, 991-1002.

Svjetska zdravstvena organizacija. Key facts, 2017., [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)), pristupljeno 15. 12. 2020.

Svjetska zdravstvena organizacija. The top 10 causes of death. 2020., <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, pristupljeno 15. 12. 2020.

Szoka P, Lachowicz J, Cwiklińska M, Lukaszewicz A, Rybak A, Baranowska U, Holownia A. Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress and Autophagy in Human Alveolar Epithelial Cell Line (A549 Cells). *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1176, 63-69.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, 140, 805-820.

Tashkin DP, Murray RP. Smoking cessation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2009, 103, 963-974.

Tatsuta M, Kan-O K, Ishii Y, Yamamoto N, Ogawa T, Fukuyama S, Ogawa A, Fujita A, Nakanishi Y, Matsumoto K. Effects of cigarette smoke on barrier function and tight junction proteins in the bronchial epithelium: protective role of cathelicidin LL-37. *Respir Res*, 2019, 20, 251.

Thiemann S, Baum LG. Galectins and Immune Responses—Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu Rev Immunol*, 2016, 34, 243-264.

Ünver R, Deveci F, Kırkıl G, Telo S, Kaman D, Kuluöztürk M. Serum Heat Shock Protein Levels and the Relationship of Heat Shock Proteins with Various Parameters in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. *Turk Thorac J*, 2016, 17, 153-159.

Vanfleteren LE, Spruit MA, Groenen M, Gaffron S, van Empel VP, Bruijnzeel PL, Rutten EP, Op 't Roodt J, Wouters EF, Franssen FM. Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187, 728-735.

Vénéreau E, De Leo F, Mezzapelle R, Careccia G, Musco G, Bianchi ME. HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacol Res*, 2016, 111, 534-544.

Vukić Dugac A, Samaržija M. Rano prepoznavanje i dijagnoza kronične opstruktivne plućne bolesti. *Medix*, 2014, 109/110, 173-175.

Yang D, Han Z, Oppenheim JJ. Alarmins and immunity. *Immunol Rev*, 2017, 280, 41-56.

Yang H, Antoine DJ, Andersson U, Tracey KJ. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol*, 2013, 93, 865-873.

Zabini D, Crnkovic S, Xu H, Tscherner M, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski A, Kwapiszewska G, Marsh LM. High-mobility group box-1 induces vascular remodelling processes via c-Jun activation. *J Cell Mol Med*, 2015, 19, 1151-1161.



Zhang S, Li X, Xie F, Liu K, Liu H, Xie J. Evaluation of whole cigarette smoke induced oxidative stress in A549 and BEAS-2B cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 54, 40-47.

Zhang WZ, Rice MC, Hoffman KL, Oromendia C, Barjaktarevic IZ, Wells JM, Hastie AT, Labaki WW, Cooper CB, Comellas AP, Criner GJ, Krishnan JA, Paine R 3rd, Hansel NN, Bowler RP, Barr RG, Peters SP, Woodruff PG, Curtis JL, Han MK, Ballman KV, Martinez FJ, Choi AM, Nakahira K, Cloonan SM, Choi ME; SPIROMICS Investigators. Association of urine mitochondrial DNA with clinical measures of COPD in the SPIROMICS cohort. *JCI Insight*, 2020, 5.

Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15, 493-518.

## 7. SAŽETAK

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) je jedan od vodećih uzročnika smrti u svijetu, što predstavlja veliki javnozdravstveni izazov. Pušenje cigareta je najčešći okolišni čimbenik rizika za razvoj KOPB-a. Budući da se dijagnosticira u relativno kasnom stadiju bolesti, postavlja se pitanje potencijalnih ranijih biljega bolesti. Dim cigarete može uzrokovati oštećenje rezidentnih stanica u plućima i dovesti do oslobađanja različitih molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva (DAMP molekule ili alarmini) u izvanstanični prostor, a koje je moguće mjeriti u tjelesnim tekućinama. Dokazano je da otpuštanje DAMP molekula potaknuto dimom cigarete može dovesti do neprikladnih upalnih reakcija kakve se eksprimiraju kod bolesnika s ovom bolešću. Ovaj diplomski rad daje pregled najnovijih saznanja o DAMP molekulama kao upalnih medijatora kod bolesnika s KOPB-om, čije su se vrijednosti u serumu / plazmi / BAL tekućini/ sputumu/ mokraći pokazale znatno različitim od onih kod zdravih pušača, ili nepušača. Pojedini alarmini (HSP27, HSP70, S100 proteini, galektini, LL-37, mokraćna kiselina, HMGB1, mtDNA i eATP) pokazuju korelaciju s različitim parametrima plućne funkcije i težinom bolesti, kao i serumskim biomarkerima za procjenu egzacerbacija KOPB-a i komorbiditeta. Nadalje, kalprotektin se pokazao potencijalnim biomarkerom diferencijacije KOPB-a i astme, dok se pomoću S100A8 mogu razlikovati KOPB i sindrom preklapanja astme i KOPB-a. U budućnosti bi klasifikacija bolesnika mogla biti olakšana budući da pojedine DAMP molekule mogu razlikovati svaku skupinu bolesnika s obzirom na GOLD ABCD klasifikaciju (težinu simptoma i povijest egzacerbacija) kao i samo prema GOLD stadijima (2 – 4 stupanj), no potrebna su daljnja istraživanja.

## SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the leading causes of death in the world and represents a major public health challenge. Cigarette smoking is the most common environmental risk factor for developing COPD. Given the fact that it is diagnosed at a relatively late stage of the disease, the question of potential earlier markers of the disease arises. Cigarette smoke can cause damage to resident cells in the lungs, leading to the release of various damage associated molecular patterns (DAMP molecules or alarmins) in the extracellular space, which can be measured in body fluids. It has been shown that the release of a DAMP molecules by cigarette smoke can lead to inappropriate inflammatory reactions such as those expressed in COPD patients. This diploma thesis provides an overview of the latest findings on DAMP molecules as inflammatory mediators in patients with COPD, and their values in serum / plasma / BAL fluid / sputum / urine were found significantly different from those in a healthy smokers, or non-smokers. Some of these alarmins (HSP27, HSP70, S100 proteins, galectins, LL-37, uric acid, HMGB1, mtDNA and eATP) show correlation with different lung function parameters and disease severity, as well as with serum biomarkers for the assessment of COPD exacerbations and comorbidities. Furthermore, calprotectin may serve as a valuable biomarker for differentiating COPD and asthma, while S100A8 is a biomarker for differentiating COPD and asthma-COPD overlap syndrome. In the future, patient classification could be facilitated as some DAMP molecules can differentiate each group of patients according to GOLD ABCD classification (severity of symptoms and history of exacerbation) as well as only according to GOLD stages (grade 2-4), but further studies are needed to validate these findings.

## 8. PRILOZI

### 8.1. Popis kratica

ACO (eng. asthma-COPD overlap syndrome) – sindrom preklapanja astme i KOPB-a

ARLs (eng. absent in melanoma (AIM) 2-like receptors) – receptori slični AIM2

ATP – adenzin-5'-trifosfat

BAL (eng. bronchoalveolar lavage) – bronhoalveolarni ispirak

CCT (eng. chaperonin containing tailless complex polypeptide 1) – šaperonini citosola eukariota

CLRs (eng. C-type lectin receptors) – lektinski receptori tipa C

CRDs (eng. carbohydrate-recognition domains) – domene koje prepoznaju ugljikohidrate

CRP – C-reaktivni protein

CSE (eng. cigarette smoke extract) – ekstrakt dima cigarete

DAMPs (eng. damage-associated molecular patterns) – molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva

eATP (eng. extracellular ATP) – izvanstanični ATP

EDN (eng. eosinophil derived neurotoxin) – neurotoksin podrijetlom iz eozinofila

eHSP70 (eng. extracellular HSP70) – izvanstanični HSP70

EMMPRIN – induktor metaloproteinaze izvanstaničnog matriksa

ER – endoplazmatski retikulum

ERK (eng. extracellular signal regulated kinase) – kinaza regulirana izvanstaničnim signalom

FEV<sub>1</sub> – forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi

FEV<sub>1</sub> / FVC – Tiffeneauov indeks

FVC – forsirani vitalni kapacitet

GM-CSF – granulocitno-makrofagni čimbenik koji stimulira koloniju

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

GSH – glutation

HIF (eng. hypoxia-inducible factor) – hipoksijom inducirani čimbenik

HLA (eng. human leukocyte antigen) – glavni sustav tkivne podudarnosti

HMGB1 (eng. high mobility group box 1) – protein visoke pokretljivosti iz skupine 1

hsCRP (eng. high-sensitivity CRP) – C-reaktivni protein visoke osjetljivosti

HSPs (eng. heat shock proteins) – proteini toplinskog šoka

ICAM-1 (eng. intercellular adhesion molecule 1) – međustanična adhezijska molekula 1

IL – interleukin

IL-1RA – receptor antagonista IL-1

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

MAPK – mitogenima aktivirane proteinske kinaze

MDSC (eng. myeloid-derived suppressor cells) – cirkulirajuće mijeloidne supresorske stanice

MMP (eng. matrix metalloproteinase) – metaloproteinaza matriksa

MPO – mijeloperoksidaza

mtDNA – mitohondrijska DNA

nAChR – nikotinski receptor

NF- $\kappa$ B – nuklearni čimbenik  $\kappa$ B

NK (eng. natural killer) – stanice prirodne ubojice

NLRs (eng. NOD-like receptors) – receptori slični NOD-u

NLS (eng. nuclear localization signals) – signali nuklearne lokalizacije

NMHC-II – neoantigeni poput ne mišićnog miozina II

P2R – P2 purinergički receptori

PAMPs (eng. pathogen-associated molecular patterns) – molekularni obrasci povezani s patogenima

PDGF (eng. platelet derived growth factor) – čimbenici rasta podrijetlom iz trombocita

PKR – protein kinaza R

pro-BNP (eng. pro-brain natriuretic peptide) – pro-natrijuretski moždani peptid

PRRs (eng. pattern recognition receptors) – receptori za prepoznavanje uzoraka

RAGE (eng. receptor for advanced glycation end products) – receptori za krajnje produkte uznapredovale glikacije

rhHMGB1 – rekombinantni humani HMGB1

rhHSP70 – rekombinantni humani HSP70

RLRs (eng. RIG-I-like receptors) – receptori slični RIG-u

ROS (eng. reactive oxygen species) – reaktivni kisikovi spojevi

RV – rezidualni volumen

s-UA – mokraćna kiselina iz seruma

SAP130 – podjedinica kompleksa histon deacetilaze

SGRQ (eng. st. George's respiratory Questionnaire) – upitnik za procjenu kronične opstruktivske plućne bolesti

TEER (eng. transepithelial electrical resistance) – transepitelni električni otpor

TFAM (eng. mitochondrial transcription factor A) – mitohondrijski transkripcijski čimbenik A

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

TGFBIp (eng. transforming growth factor-beta-induced protein) – protein induciran transformirajućim čimbenikom rasta beta

TLC (eng. total lung capacity) – ukupni plućni kapacitet

TLRs (eng. Toll-like receptors) – receptori slični Toll-u

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

u-mtDNA – mitohondrijska DNA u mokraći

UCR (eng. uric acid to creatinine ratio) – omjer mokraćne kiseline i kreatinina

VCAM-1 (eng. vascular cell adhesion molecule 1) – vaskularna stanična adhezijska molekula 1

## MOLEKULARNI OBRASCI POVEZANI S OŠTEĆENJEM TKIVA KAO MEDIJATORI UPALE U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI

Višnja Rešić

### SAŽETAK

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je jedan od vodećih uzročnika smrti u svijetu, što predstavlja veliki javnozdravstveni izazov. Pušenje cigareta je najčešći okolišni čimbenik rizika za razvoj KOPB-a. Budući da se dijagnosticira u relativno kasnom stadiju bolesti, postavlja se pitanje potencijalnih ranijih biljega bolesti. Dim cigarete može uzrokovati oštećenje rezidentnih stanica u plućima i dovesti do oslobađanja različitih molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem tkiva (DAMP molekule ili alarmini) u izvanstanični prostor, a koje je moguće mjeriti u tjelesnim tekućinama. Dokazano je da otpuštanje DAMP molekula potaknuto dimom cigarete može dovesti do neprikladnih upalnih reakcija kakve se eksprimiraju kod bolesnika s ovom bolešću. Ovaj diplomski rad daje pregled najnovijih saznanja o DAMP molekulama kao upalnih medijatora kod bolesnika s KOPB-om, čije su se vrijednosti u serumu / plazmi / BAL tekućini/ sputumu/ mokraći pokazale znatno različitim od onih kod zdravih pušača, ili nepušača. Pojedini alarmini (HSP27, HSP70, S100 proteini, galektini, LL-37, mokraćna kiselina, HMGB1, mtDNA i eATP) pokazuju korelaciju s različitim parametrima plućne funkcije i težinom bolesti, kao i serumskim biomarkerima za procjenu egzacerbacija KOPB-a i komorbiditeta. Nadalje, kalprotektin se pokazao potencijalnim biomarkerom diferencijacije KOPB-a i astme, dok se pomoću S100A8 mogu razlikovati KOPB i sindrom preklapanja astme i KOPB-a. U budućnosti bi klasifikacija bolesnika mogla biti olakšana budući da pojedine DAMP molekule mogu razlikovati svaku skupinu bolesnika s obzirom na GOLD ABCD klasifikaciju (težinu simptoma i povijest egzacerbacija) kao i samo prema GOLD stadijima (2 – 4 stupanj), no potrebna su daljnja istraživanja.

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

Rad sadrži: 67 stranica, 8 grafičkih prikaza, 2 tablice i 106 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB), molekularni obrasci povezani s oštećenjem tkiva (DAMP molekule), dim cigarete, upala

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. Andrea Hulina Tomašković**, *poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj, 2021.



## **DAMAGE-ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS AS MEDIATORS OF INFLAMMATION IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

**Višnja Rešić**

### **SUMMARY**

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the leading causes of death in the world and represents a major public health challenge. Cigarette smoking is the most common environmental risk factor for developing COPD. Given the fact that it is diagnosed at a relatively late stage of the disease, the question of potential earlier markers of the disease arises. Cigarette smoke can cause damage to resident cells in the lungs, leading to the release of various damage associated molecular patterns (DAMP molecules or alarmins) in the extracellular space, which can be measured in body fluids. It has been shown that the release of a DAMP molecules by cigarette smoke can lead to inappropriate inflammatory reactions such as those expressed in COPD patients. This diploma thesis provides an overview of the latest findings on DAMP molecules as inflammatory mediators in patients with COPD, and their values in serum / plasma / BAL fluid / sputum / urine were found significantly different from those in a healthy smokers, or non-smokers. Some of these alarmins (HSP27, HSP70, S100 proteins, galectins, LL-37, uric acid, HMGB1, mtDNA and eATP) show correlation with different lung function parameters and disease severity, as well as with serum biomarkers for the assessment of COPD exacerbations and comorbidities. Furthermore, calprotectin may serve as a valuable biomarker for differentiating COPD and asthma, while S100A8 is a biomarker for differentiating COPD and asthma-COPD overlap syndrome. In the future, patient classification could be facilitated as some DAMP molecules can differentiate each group of patients according to GOLD ABCD classification (severity of symptoms and history of exacerbation) as well as only according to GOLD stages (grade 2-4), but further studies are needed to validate these findings.

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

Thesis includes: 67 pages, 8 figures, 2 tables and 106 references. Original is in Croatian language.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease (COPD), damage-associated molecular patterns (DAMP molecules), cigarette smoke, inflammation

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  
**Andrea Hulina Tomašković, Ph.D.** *Postdoctoral Researcher*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2021.