

# Uloga izvanstaničnih adenozin-trifosfata i proteina toplinskoga šoka 70 u kroničnoj opstruktivskoj plućnoj bolesti

---

Tomljanović, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:043621>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



**Matea Tomljanović**

**ULOGA IZVANSTANIČNIH ADENOZIN-  
TRIFOSFATA I PROTEINA TOPLINSKOGA  
ŠOKA 70 U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ  
PLUĆNOJ BOLESTI**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Lade Rumora.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ladi Rumori na savjetima i pomoći prilikom izrade diplomskog rada, te svojoj obitelji i prijateljima na podršci tokom studija.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	4
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	5
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	6
<b>4.1. KOPB</b> .....	6
4.1.1. Definicija i etiologija .....	6
4.1.2. Patogeneza .....	7
4.1.3. Dijagnostika .....	8
4.1.4. Terapija KOPB-a .....	10
<b>4.2. ATP</b> .....	13
4.2.1. Izvanstanični ATP .....	13
4.2.2. Purinergijski receptori na stanicama imunskog sustava .....	14
4.2.3. Uloga eATP-a u KOPB-u .....	20
<b>4.3. Hsp70</b> .....	22
4.3.1. Struktura i funkcija .....	22
4.3.2. Izvanstanični Hsp70 .....	24
4.3.3. Receptori i unutarstanični signalni putevi .....	25
4.3.4. Uloga izvanstaničnog Hsp70 (eHsp70) u KOPB-u .....	28
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	30
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	31
6.1. Popis kratica .....	31
<b>7. LITERATURA</b> .....	34
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	40
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b> .....	42

## 1. UVOD

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) je progresivna bolest dišnih putova nastala zbog kombinacije dugotrajne izloženosti štetnim agensima (različitim plinovima i česticama) te individualnih čimbenika kao što su hiperosjetljivost dišnih putova i nepravilan razvoj pluća tijekom djetinjstva. Prevalencija KOPB-a izravno je povezana s pušenjem duhana, a u mnogim zemljama i s onečišćenjem zraka uzrokovanog izgaranjem drva i goriva.

Jedna je od vodećih uzroka smrtnosti u svijetu što predstavlja socijalni i ekonomski trošak čiji se rast predviđa u narednim desetljećima zbog kontinuirane izloženosti rizičnim čimbenicima te zbog starenja svjetske populacije. Prevalencija, morbiditet i mortalitet se razlikuju među zemljama, a podaci o prisutnosti KOPB-a značajno variraju zbog različitih metoda istraživanja, dijagnostičkih kriterija i analitičkih pristupa. Osviještenost o ovoj bolesti je neadekvatna, što dovodi i do nedostatne dijagnostike (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2022).

Usporedba podataka iz 1990. i 2010. godine pokazuje značajan porast prevalencije KOPB-a, pri čemu je broj oboljelih 1990. godine iznosio 227,3 milijuna, što odgovara svjetskoj prevalenciji od 10,7 %, dok je 2010. godine broj oboljelih iznosio 384 milijuna, što odgovara svjetskoj prevalenciji od 11,7 % (Adeloye i sur., 2015). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji KOPB je treći vodeći uzrok smrti u svijetu, s 3,23 milijuna smrtnih slučajeva u 2019. godini, od čega je 80 % u zemljama s niskim i srednjim dohotkom. Zbog povećane incidencije pušenja i starenja populacije u razvijenim zemljama predviđa se porast prevalencije KOPB-a tijekom sljedećih 40 godina i smatra se da će do 2060. godine biti 5,4 milijuna smrti godišnje zbog KOPB-a i povezanih bolesti (GOLD, 2022). Pravovremena dijagnoza i liječenje, uključujući pomoć prilikom odvikavanja od pušenja, potrebni su kako bi se smanjila progresija simptoma i reducirale egzacerbacije bolesti. Dijagnoza se potvrđuje spirometrijskim testovima u pacijenata koji imaju tipične simptome, međutim spirometrija nije uvijek dostupna zbog financijskih razloga što dovodi do izostanka dijagnoze.

Tijekom progresije bolesti pacijentima postaje otežano izvršavanje normalnih dnevnih aktivnosti te su financijski opterećeni, kako zbog troškova liječenja, tako i zbog smanjene produktivnosti na radnom mjestu. Egzacerbacije bolesti mogu dovesti i do potrebe za hospitalizacijom te biti životno ugrožavajuće. Često se javljaju i druge zdravstvene

komplikacije, primjerice bolesti srca, osteoporoza, karcinom pluća, depresija i anksioznost ([www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))).

Jedan od većih problema u dijagnostici i liječenju KOPB-a jest dugačak tijek same bolesti i tek poneki simptomi u ranoj fazi što dovodi do nedostatne dijagnostike. Rani KOPB odnosi se na period u kojem bolest tek počinje, a to je period u kojem 70 % pacijenata nema nikakve simptome ili ima blage respiracijske simptome. Tijekom progresije bolesti simptomi se postepeno pojačavaju te privlače pažnju pacijenata, međutim to je već stanje u kojem je funkcija pluća oštećena. Rana detekcija i liječenje mogli bi usporiti progresiju bolesti, poboljšati kvalitetu života te smanjiti troškove liječenja. Trenutno nema standardnih postupaka koji bi omogućili dijagnozu u tako ranoj fazi bolesti, što predstavlja izazov u liječenju jednom kad se bolest otkrije budući da farmakološkom terapijom nije moguće postići potpuno izlječenje. Ukoliko se pronađe način koji omogućuje otkrivanje bolesti na samom početku, mogle bi se provesti preventivne mjere s ciljem sprječavanja progresije ili njezinog odgađanja.

Mehanizam razvoja bolesti je kompleksan i dugotrajan te obuhvaća različite procese, od kronične upale, ozljede, popravka tkiva, strukturnog remodeliranja respiracijskog trakta pa sve do uočljivih promjena u funkciji pluća. Neka istraživanja predlažu da se bolesti malih dišnih putova javljaju kao najranija faza KOPB-a, prije razvoja emfizema. Ukoliko se dijagnoza postavi pravovremeno, tj. u fazi strukturnih promjena na plućnom tkivu, mogla bi se značajno odgoditi progresija te time smanjiti i težina bolesti, a posljedično i mortalitet.

Kriterij na kojem se temelji dijagnostika i klasifikacija bolesti prema službenim smjernicama, a to je funkcija pluća, ostavlja prostora za pogreške, odnosno često neprepoznate dijagnoze kod mlađih pacijenata te prekomjerne dijagnoze kod starije populacije. Kako bi točnost postavljene dijagnoze bila što veća potrebno je uzeti u obzir činjenicu da plućna funkcija starenjem opada kao i činjenicu da emfizem može biti prisutan duži period bez pojave simptoma. Simptomi i promjene u funkciji pluća javljaju se tek kada je oštećenje plućnog parenhima veće od 30 %. Stoga plućna funkcija ne bi trebala biti jedini kriterij za dijagnosticiranje bolesti, već bi se trebala kombinirati s drugim metodama. Jedna od mogućnosti je kombiniranje smjernica Globalne inicijative za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases) s računalnom tomografijom, tj. CT-om (*engl.* computed tomography). CT omogućuje temelj za postavljanje rane dijagnoze, primjerice kod asimptomatskih pušača s urednom plućnom funkcijom, jer

može detektirati strukturne promjene u plućnom tkivu. Također, postoji značajan interes za otkrivanjem potencijalnih biomarkera koji bi uvelike doprinijeli ranoj dijagnozi. Rani KOPB javlja se na biokemijskoj i molekulskoj staničnoj razini, a upalni markeri mogli bi igrati ključnu ulogu u ranim fazama i predikciji bolesti. Neki od biomarkera povezanih s oštećenom plućnom funkcijom su C-reaktivni protein (CRP) te matriksne metaloproteinaze (MMP, *engl.* matrix metalloproteinase) 1, 7 i 9. Zbog ograničenja u metodama detekcije neki biomarkeri su još u fazi istraživanja i trebali bi biti potvrđeni daljnjim istraživanjima (Lu i sur., 2021).

Ovaj rad temelji se na hipotezi da bi izvanstanični adenzin-trifosfat (ATP) i izvanstanični protein toplinskoga šoka 70 (Hsp70, *engl.* heat shock protein 70) mogli služiti kao biomarkeri važni za predviđanje bolesti u ranoj fazi čime bi olakšali dijagnostiku i daljnje liječenje. U nastavku rada detaljnije su obrađene njihove funkcije, receptori, unutarstanični signalni putovi te njihova važnost i poveznica s KOPB-om. Obje molekule djeluju kao molekularni obrasci povezani s oštećenjem (DAMP, *engl.* danger-associated molecular pattern). To su endogene molekule koje se oslobađaju iz oštećenih ili umirućih stanica te aktiviraju urođeni imunski odgovor interakcijom s receptorima koji prepoznaju određene obrasce. Budući da su upala i imunski odgovor upletene u gotovo sve patologije, sve je više studija u kojima se istražuju DAMP molekule, a postoji i mogućnost da će se u budućnosti DAMP-ovi koristiti kao potencijalne terapijske mete ili terapeutici (Land, 2020).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Cilj ovog diplomskog rada je napraviti pregled dostupnih podataka o KOPB-u te izvanstaničnom ATP-u i izvanstaničnom Hsp70 kao potencijalnim markerima za ranu dijagnostiku. KOPB je bolest koja predstavlja veliki javnozdravstveni problem budući da pogađa skoro 400 milijuna ljudi godišnje, a Svjetska zdravstvena organizacija je predvidjela da će 2030. godine postati treći vodeći uzrok smrtnosti u svijetu. Uzimajući u obzir činjenicu da je informiranost i edukacija o bolesti nedovoljna, dijagnostika nedostatna, a smrtnost izuzetno velika, potrebna su daljnja istraživanja na ovu temu.



### **3. MATERIJALI I METODE**

Glavna metoda korištena prilikom izrade ovog teorijskog diplomskog rada je pretraživanje znanstvene literature pomoću ključnih riječi važnih za određeno poglavlje diplomskog rada. Za pretraživanje literature upotrijebljen je Google Scholar kao internetski pretraživač namijenjen za znanstvenu literaturu, a od baza podataka su korišteni PubMed i ScienceDirect. Literaturu čine članci iz znanstvenih časopisa, ulomci iz knjiga, smjernice GOLD-a te javno dostupan sadržaj sa službenih internetskih stranica, kao što je službena stranica Svjetske zdravstvene organizacije. Kriteriji za odabir materijala korištenih u ovom radu su citiranost i datum objave, pri čemu su birani najnoviji radovi koji obrađuju relevantne teme.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. KOPB

#### 4.1.1. Definicija i etiologija

KOPB je bolest karakterizirana perzistentnim respiracijskim simptomima i ograničenjem protoka zraka uzrokovanih abnormalnostima alveola i dišnih putova koja najčešće nastaje zbog značajne izloženosti štetnim agensima. Prijašnje definicije navodile su kombinaciju emfizema i kroničnog bronhitisa kao glavne karakteristike KOPB-a. U najnovijim definicijama ta dva pojma nisu korištena u tom kontekstu budući da emfizem opisuje samo jednu od nekoliko strukturnih abnormalnosti prisutnih kod pacijenata, a kronični bronhitis nije prisutan kod većine oboljelih. Kronični bronhitis definira se kao prisutnost kašlja i produkcija sputuma tijekom 3 mjeseca kroz dvije uzastopne godine. Emfizem je stanje pluća karakterizirano abnormalnim, trajnim povećanjem alveola, sve do terminalnih bronhiola, popraćeno destrukcijom i stanjivanjem njihovih stjenki (Thurlbeck i Müller, 1994; GOLD, 2022).

KOPB je posljedica složenih interakcija između genskih i okolišnih čimbenika, a na razvoj i progresiju bolesti utječu pušenje, genske predispozicije, dob, spol, rast i razvoj pluća, izloženost česticama, socioekonomski status te prisutnost astme, hiperosjetljivosti dišnih putova, kroničnog bronhitisa te infekcija. Pušenje je vodeći okolišni čimbenik koji pridonosi razvoju bolesti, dok je od genskih čimbenika to deficijencija  $\alpha$ 1-antitripsina. U prošlosti je većina istraživanja pokazivala kako muškarci više oboljevaju od KOPB-a, međutim noviji podaci pokazuju porast broja oboljelih žena što se povezuje s promjenom obrazaca pušenja duhana. Socioekonomski status može biti povezan s težinom djeteta pri rođenju pa tako utjecati na rast i razvoj pluća. Poznavanje potencijalnih faktora rizika, kao i njihove međusobne povezanosti, ključno je kako bi se bolest mogla razumjeti, stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se povećala mogućnost prevencije i pravovremene dijagnoze (GOLD, 2022).

#### 4.1.2. Patogeneza

Upala dišnih putova kod pacijenata s KOPB-om uzrokovana kroničnim iritansima, kao što je dim cigareta, razlikuje se od normalne upalne reakcije dišnog sustava. Mehanizam takvog pojačanog upalnog odgovora nije još u potpunosti razjašnjen, ali je barem manjim dijelom genski određen s obzirom da obolijevaju i nepušači. Smatra se da je uzrok patoloških promjena kombinacija različitih mehanizama kao što su oksidacijski stres, narušena ravnoteža proteaza i antiproteaza te upala posredovana određenim stanicama i medijatorima.

Oksidacijski stres uzrokovan je dimom cigareta i drugim udahnutim česticama koje uzrokuju oslobađanje oksidansa iz aktiviranih stanica imunskog sustava kao što su makrofagi i neutrofil. Razina oksidacijskog stresa dodatno je povišena prilikom egzacerbacija bolesti što pokazuje povišena razina biomarkera, primjerice vodikovog peroksida, u izdahnutom kondenzatu zraka, sputumu i sistemskej cirkulaciji.

Kod pacijenata je primijećena narušena ravnoteža između proteaza koje razgrađuju komponente vezivnog tkiva u plućima i antiproteaza koje se suprotstavljaju njihovom djelovanju. U normalnim uvjetima elastaza neutrofila razgrađuje elastin, a njezinom djelovanju se suprotstavlja  $\alpha$ 1-antitripsin (AAT) koji ju inhibira, čime se održava ravnoteža. Kod KOPB-a prisutna je deficijencija  $\alpha$ 1-antitripsina (AATD, *engl.* alpha-1 antitrypsin deficiency) pa nedovoljna količina enzima dolazi do pluća i potrebno je više vremena kako bi se elastaza inhibirala, što posljedično dovodi do pretjerane razgradnje elastina i uzrokuje emfizem. Većina ljudi nosi dvije kopije divljeg tipa M-alela gena *SERPINA1* koji kodira za AAT i imaju dovoljne razine cirkulirajućeg proteina dok ozbiljni slučajevi deficijencije AAT-a nastaju zbog homozigotne zamjene samo jedne aminokiseline na poziciji 342, pri čemu je glutaminska kiselina zamijenjena lizinom (Strnad i sur., 2020; GOLD, 2022).

Upalni odgovor kod KOPB-a karakteriziran je povišenom koncentracijom makrofaga u plućnom parenhimu, plućnim krvnim žilama te perifernim dišnim putovima, kao i povišenom koncentracijom neutrofila i limfocita. Stanice imunskog sustava zajedno s epitelnim i drugim strukturnim stanicama stvaraju velike količine upalnih medijatora koji djeluju kao kemoatraktanti i privlače druge stanice imunskog sustava iz cirkulacije čime se upalni proces amplificira te se induciraju strukturne promjene (GOLD, 2022). Kod pacijenata s KOPB-om značajna je akumulacija upalnih stanica u donjim dijelovima respiracijskog trakta, a isti je slučaj i kod gotovo svih pušača. Nije poznato koji bi čimbenici mogli ukazivati da će

određena osoba razviti ozbiljnije ograničenje u protoku zraka. Prisutnost upalnih stanica uzrokuje povišene koncentracije upalnih citokina, od kojih su u sputumu najčešće detektirani interleukin-8 (IL-8), čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , *engl.* tumor necrosis factor  $\alpha$ ) i kemokinski ligand 1 s C-X-C motivom (CXCL1, *engl.* C-X-C motif ligand 1). Dokazano je da koncentracije tih citokina kod KOPB-a ostaju povišene tijekom trajanja bolesti. Također su pronađene povišene koncentracije kemotaksijskih faktora i njihovih receptora u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) i plućnom tkivu. Kod KOPB-a citokini imaju izravnu ulogu u procesu oštećenja tkiva i remodeliranju dišnih putova. Primjer koji to potvrđuje je ispitivanje inducibilnog IL-13 na transgeničnim miševima koje su proveli Zheng i suradnici (Zheng i sur., 2000). IL-13, inače značajan za upalu tkiva kod astme, uzrokovao je povišenje ekspresije matriksnih metaloproteinaza čime je doveo do značajnog alveolarnog povećanja, abnormalnosti slične emfizemu, zbog narušavanja ravnoteže između proteaza i antiproteaza. Početna hipoteza o ulozi ravnoteže između ovih enzima odnosila se na elastazu neutrofila i  $\alpha$ 1-antitripsin, a danas se može proširiti i na druge enzime koji razgrađuju elastin. Tu ubrajamo nekoliko serinskih proteaza, matriksnih metaloproteaza te cisteinskih proteaza. Pronađene su u plućima pacijenata s KOPB-om te je proučavan njihov doprinos u razvoju emfizema. Inhibitori ovih enzima također su prisutni u normalnom plućnom tkivu, čime se potvrđuje ovaj prošireni koncept ravnoteže proteaza i antiproteaza. Posljedica narušene ravnoteže je degradacija elastina što dovodi do gubitka tkiva, promijenjene strukture alveola te emfizema (Spurzem i Rennard, 2005).

#### **4.1.3. Dijagnostika**

Osobe kod kojih su prisutni dispneja, kronični kašalj i/ili produkcija sputuma u kombinaciji s izloženošću rizičnim faktorima upućuju se na spirometrijski test kako bi se utvrdila prisutnost ili odsutnost KOPB-a. Jedan od problema za postavljanje pravovremene dijagnoze jest zanemarivanje simptoma od strane pacijenata. Većinu pacijenata čine pušači, a početni simptomi su najčešće blagi pa ih pacijenti često pripisuju posljedicama pušenja. To dovodi do navikavanja na respiracijske probleme pa se tek u kasnijim fazama javljaju liječnicima koji im spirometrijom postave dijagnozu. Spirometrija je reproducibilna, objektivna, lako dostupna i neinvazivna metoda za određivanje ograničenja protoka zraka u dišnim putovima. Mjeri forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi (FEV<sub>1</sub>, *engl.* forced expiratory volume in one second) i forsirani vitalni kapacitet (FVC, *engl.* forced vital capacity). Postdilatacijski omjer FEV<sub>1</sub>/FVC poznat je pod nazivom Tiffeneau-Pinelli indeks, a daje nam informaciju o

prisutnosti bolesti, tj. o ograničenju protoka zraka kroz dišne putove. Uspoređuje se s referentnim vrijednostima koje u obzir uzimaju dob, spol, rasu i visinu. Kriterij koji potvrđuje KOPB je fiksna vrijednost  $FEV_1/FVC < 0,70$ , što može dovesti do češćeg dijagnosticiranja kod pacijenata starijih od 70 godina i rjeđeg kod pacijenata mlađih od 45 godina. Pacijenti koji su pozitivno dijagnosticirani dijele se u 4 stadija s obzirom na težinu bolesti prema vrijednostima za  $FEV_1$ , kao što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Podjela pacijenata u GOLD stadije prema GOLD smjernicama na temelju vrijednosti  $FEV_1$  (GOLD, 2022).

<b>KLASIFIKACIJA PACIJENATA S KOPB-OM TEMELJENA NA POSTBRONHODILATACIJSKOJ VRIJEDNOSTI <math>FEV_1</math></b>		
Za pacijente kojima je utvrđen $FEV_1/FVC < 0,70$ :		
GOLD 1	blaga	$FEV_1 \geq 80\%$ očekivane
GOLD 2	umjerena	$50\% \leq FEV_1 < 80\%$ očekivane
GOLD 3	jaka	$30\% \leq FEV_1 < 50\%$ očekivane
GOLD 4	vrlo jaka	$FEV_1 < 30\%$ očekivane

Nakon postavljanja dijagnoze potrebno je utvrditi razinu ograničenja protoka zraka, utjecaj na zdravlje pacijenta te potencijalne buduće događaje, kao što su egzacerbacije i hospitalizacije, kako bi se primijenila prikladna terapija. Spirometrija sama po sebi ne daje dovoljno informacija pa se koriste različiti upitnici kako bi se saznali simptomi pacijenata. Dva najčešće korištena upitnika su modificirana skala zaduhe (mMRC, *engl.* Modified British Medical Research Council Questionnaire) i test za procjenu KOPB-a (CAT, *engl.* COPD Assesment Test). Rezultati dobiveni upitnicima te informacije o egzacerbacijama i

hospitalizacijama tijekom prethodnih godinu dana omogućuju podjelu pacijenata u skupine, prikazane u Tablici 2, koje se koriste kako bi se odabrala odgovarajuća terapija za pacijenta.

Tablica 2. Podjela pacijenata u GOLD skupine prema GOLD smjernicama obzirom na prisutnost egzacerbacija i simptome prema mMRC ili CAT upitnicima (GOLD, 2022).

<b>C</b>	<b>D</b>	$\geq 2$ egzacerbacije ili $\geq 1$ koja zahtijeva hospitalizaciju
<b>A</b>	<b>B</b>	0 – 1 egzacerbacija (koja ne zahtijeva hospitalizaciju)
mMRC 0 – 1 CAT < 10	mMRC $\geq 2$ CAT $\geq 10$	

#### 4.1.4. Terapija KOPB-a

Liječenje KOPB-a sastoji se od nefarmakoloških mjera i farmakološke terapije. Svi pacijenti, bez obzira kojoj GOLD skupini pripadaju, trebali bi provoditi nefarmakološke mjere koje upotpunjuju terapiju, a obuhvaćaju prestanak pušenja, fizičku aktivnost i cijepljenje. GOLD smjernice preporučuju cijepljenje ovisno o nacionalnim smjernicama, što može uključivati cijepljenje protiv gripe, hripavca, bakterije *Streptococcus pneumoniae* i Covid-19 virusa. Pacijentima B, C i D skupine preporučuje se i rehabilitacija pluća. Od svih nefarmakoloških mjera najveći naglasak se stavlja na prestanak pušenja zbog njegovog negativnog utjecaja na prognozu i progresiju bolesti, a značajan broj pacijenata nastavlja s pušenjem unatoč postavljenoj dijagnozi. Kako bi se pacijentima pomoglo pri odvikavanju od cigareta, mogu se koristiti nikotinske zamjene, elektroničke cigarete ili lijekovi poput bupropiona i vareniklina.

Farmakološka terapija koristi se za smanjenje simptoma, učestalosti i težine egzacerbacija te za poboljšanje zdravstvenog statusa. Lijekove možemo podijeliti u dvije glavne skupine, a to su bronhodilatacijski i protuupalni lijekovi.

Najviše korišteni bronhodilatacijski lijekovi su  $\beta$ 2-agonisti i antimuskarinski lijekovi. Agonisti  $\beta$ 2-adrenoreceptora uzrokuju bronhodilataciju izravno, djelujući na glatke mišiće bronha, i posredno, inhibicijom bronhokonstriktorskih medijatora. Aktivacija receptora uzrokuje aktivaciju adenilat-ciklaze i stvaranje cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) što dovodi do aktivacije protein-kinaze A i fosforilacije ciljnih proteina u prometu kalcija. Povećava se aktivnost  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aze čime se smanjuje unutarstanična koncentracija kalcija, a time i kontraktilnost mišića. Posredno djelovanje obuhvaća inhibiciju lučenja histamina i leukotriena D4 te inhibiciju egzocitoze acetilkolina iz kolinergičnih neurona.  $\beta$ 2-agoniste možemo podijeliti na kratkodjelujuće (SABA, *engl.* short-acting beta-agonist), čiji učinak traje 4 do 6 sati, i dugodjelujuće (LABA, *engl.* long-acting beta-agonist), čiji učinak traje 12 ili više sati. U kratkodjelujuće ubrajamo salbutamol, fenoterol, levalbuterol i terbutalin, a u dugodjelujuće formoterol, indakaterol, olodaterol i salmeterol.

Antimuskarinski lijekovi inhibiraju muskarinske receptore eksprimirane na glatkim mišićima dišnih putova. Acetilkolin preko M3 muskarinskih receptora na stanicama glatkih mišića uzrokuje bronhokonstrikciju, preko M1 i M3 receptora na submukoznim žlijezdama uzrokuje sekreciju sluzi, a preko M1 receptora na epitelnim stanicama posredno regulira kemotaksiju. Lijekovi najviše djeluju blokirajući M3 receptore što dovodi do bronhodilatacije. S obzirom na trajanje učinka, antimuskarinske lijekove dijelimo na kratkodjelujuće (SAMA, *engl.* short-acting muscarinic antagonist), poput ipratropij bromida i oksitropij bromida, te dugodjelujuće (LAMA, *engl.* long-acting muscarinic antagonist), poput aklidinij bromida, glikopironij bromida, tiotropija, umeklidinija, glikopirolata i revefenacina (Brunton i sur., 2005.; GOLD, 2022).

Protuupalni lijekovi koji se koriste u liječenju KOPB-a su inhalacijski kortikosteroidi, oralni glukokortikoidi, inhibitori fosfodiesteraze 4, antibiotici, mukoregulatori i drugi protuupalni lijekovi. Najčešće se koriste inhalacijski kortikosteroidi u koje ubrajamo budezonid, mometazon, beklometazon, flutikazon propionat i flutikazon furoat. Njihova uloga je kontrola upale u pozadini bolesti, a učinak postižu smanjenjem broja upalnih stanica, citokina i medijatora upale.

Izbor terapije ovisi o skupini kojoj pacijenti pripadaju prema GOLD smjernicama. Početna terapija za pacijente iz skupine A je bronhodilatator, iz skupine B je dugodjelujući bronhodilatator, a iz skupine C je LAMA. Početna terapija za pacijente iz skupine D ovisi o težini simptoma i broju eozinofila u krvi po mikrolitru, a može biti LAMA, kombinacija LAMA-e i LABA-e ili kombinacija LABA-e s inhalacijskim kortikosteroidom. Potrebe za

daljnjim farmakološkim intervencijama procjenjuju se individualno, s obzirom na odgovor pacijenta na lijekove, dispneju i egzacerbacije.

Pravilan izbor lijekova i njihova primjena, pridržavanje nefarmakoloških mjera i promjena životnog stila mogu omogućiti smanjenje simptoma i odgoditi progresiju bolesti, ali ne mogu dovesti do potpunog izlječenja jer se KOPB s vremenom pogoršava (GOLD, 2022).



## 4.2. ATP

ATP je nukleotid sastavljen od adenina, riboze i trifosfata, a trifosfatni dio molekule sadrži dvije fosfodieterske veze bogate energijom što molekulu čini izvorom slobodne energije u biološkim sustavima. Hidrolizom ATP-a se oslobađa velika količina energije koja služi kao pogonska energija u reakcijama koje zahtijevaju dotok slobodne energije. Neprestano se stvara i troši, a bez stalne regeneracije iz adenzin-difosfata (ADP) ne bi bilo moguće kretanje, aktivni transport, pojačanje signala niti biosinteze (Stryer i sur., 2002).

### 4.2.1. Izvanstanični ATP

Izvanstanični ATP (eATP, *engl.* extracellular adenosine triphosphate) djeluje kao DAMP, odnosno molekularni obrazac povezan s oštećenjem. Oslobađa se iz različitih stanica prilikom oštećenja ili stanične smrti, ali se može oslobađati i tijekom procesa koji nisu povezani s oštećenjima stanice, primjerice iz aktiviranih makrofaga, neutrofila, trombocita, te epitelnih i endotelnih stanica (Hlapčić i sur., 2019).

U zdravom organizmu ATP je prisutan gotovo isključivo unutar stanica, dok mu je koncentracija u izvanstaničnom mediju zanemariva. Takav veliki koncentracijski gradijent povećava brzinu oslobađanja ATP-a u slučaju kidanja stanične membrane. Eukariotske stanice imaju specifične receptore za eATP što ga čini idealnim glasnikom koji signalizira oštećenje stanice (Di Virgilio i Vuerich, 2015).

U izvanstaničnom mediju ATP se razgrađuje ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolazom 1 (CD39, *engl.* cluster of differentiation 39) do adenzin-monofosfata (AMP) te 5'-nukleotidazom (CD73) do adenzina, koji je glavni produkt razgradnje. Oslobađanje nukleotida stvara koncentracijski gradijent koji potiče kemotaksiju temeljenu i na ATP-u i na adenzinu budući da usmjereno kretanje stanica imunskog sustava zahtijeva blisku suradnju ova dva purina.

Izvanstanični nukleotidi privlače stanice imunskog sustava na mjesto upale izravno, tako što povećavaju motilitet stanica, i neizravno, oslobađanjem kemotaksijskih faktora iz stromalnih ili rezidentih imunskih stanica.

Purinergijsko signaliziranje igra važnu ulogu u kemotaksiji različitih tipova stanica.

Izvanstanični nukleotidi privlače upalne stanice na mjesto upale povećanjem motiliteta stanice ili oslobađanjem kemotaksijskih faktora. Uz ostale nukleotide, pokazano je da uridin-trifosfat

(UTP) ima jaku kemotaksijsku aktivnosti prema neutrofilima, monocitima te dendritičkim stanicama. Kod humanih monocita i eozinofila UTP i uridin-difosfat (UDP) potiču migraciju stanica te uzrokuju oslobađanje IL-8, čime se potiče daljnja upala i aktivacija stanica. Slično tome, fibroblasti i endotelne stanice oslobađaju monocitni kemotaksijski protein 1 (MCP1, *engl.* monocyte chemotactic protein 1) i IL-6. Niske koncentracije nukleotida koji djeluju na P2Y receptore jako potiču kemotaksiju, dok visoke koncentracije ATP-a na mjestu upale djeluju kao “stop signal”, inhibirajući daljnju pokretljivost stanica, vjerojatno preko P2X7 receptora. U nekim slučajevima, primjerice kod kemotaksije humanih neutrofila, do kemotaksije dolazi nakon bliske suradnje ATP-a i izvanstaničnog adenzina pri čemu ATP usmjerava, a adenzin preko A3 receptora potiče migraciju (Di Virgilio i Vuerich, 2015).

#### **4.2.2. Purinergijski receptori na stanicama imunskog sustava**

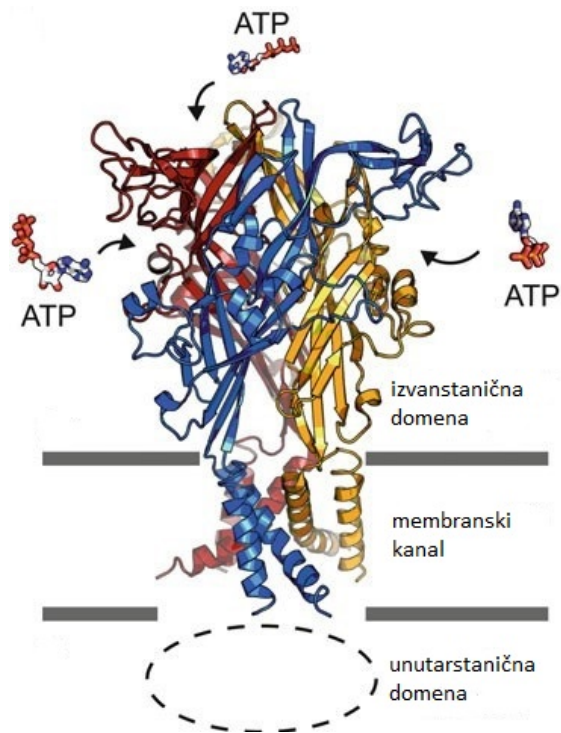
Purinergijske receptore koje pronalazimo na stanicama imunskog sustava dijelimo na P1 i P2 receptore.

P1 receptori su purinergijski receptori koji vežu adenzin, široko su rasprostranjeni na stanicama imunskog sustava, a podijeljeni su na 4 podtipa (A1, A2A, A2B i A3). Uloga A1 i A3 nije razjašnjena, dok A2A i A2B imaju ulogu u kontroli upale. Povezani su s mobilizacijom unutarstaničnog kalcija čime sudjeluju u aktivaciji ili inhibiciji različitih signalnih putova, a djeluju prvenstveno imunosupresijski (Di Virgilio i Vuerich, 2015).

P2 receptori su purinergijski receptori za eATP te su široko rasprostranjeni u plućima. Vezanje eATP-a za receptore na makrofagima i neutrofilima dovodi do izlučivanja upalnih molekula i medijatora koji potiču razaranje tkiva što doprinosi kroničnoj upali kod KOPB-a. Receptore dijelimo u dvije skupine, P2X i P2Y (Hlapčić i sur., 2019).

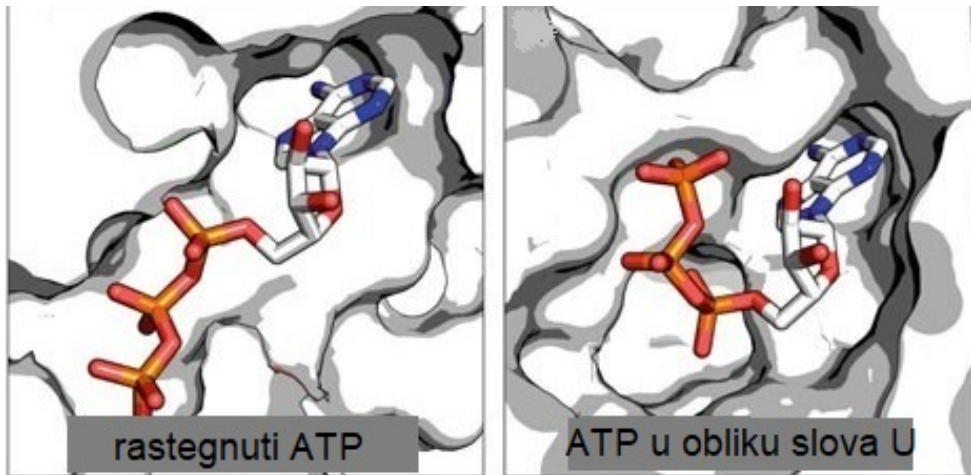
**P2X** receptore dijelimo na sedam podtipova, a to su P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 i P2X7. Specifični su za ATP, ali ga vežu slabim afinitetom. Jedan od značajnijih receptora je P2X7R budući da istraživanja pokazuju njegovu važnu ulogu u aktivaciji višeproteinskog kompleksa koji sadrži receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR, *engl.* nucleotide-binding oligomerisation domain (NOD) - like receptor) s N-terminalnom pirinskom domenom tipa 3 (NLRP3, *engl.* NOD-like receptor pyrin 3) (Eltom i sur., 2011).

P2X receptori su izvanstanični neselektivni kationski kanali građeni kao trimeri koji su ovisni o ATP-u. Ubrajamo ih u posebnu skupinu ionskih kanala ovisnih o ligandima koji se sastoje od 6 transmembranskih uzvojnica i relativno male izvanstanične domene koja ima 3 vezna mjesta za ATP (Slika 1.) (Kawate, 2017).



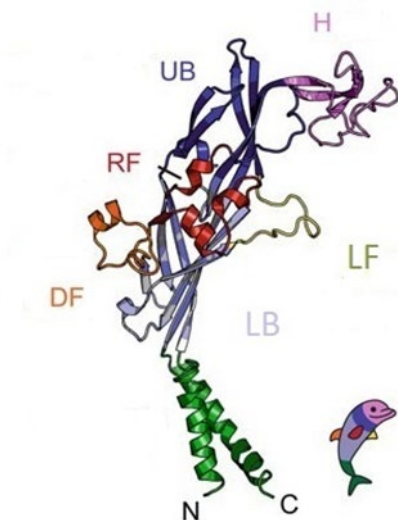
Slika 1. Struktura P2X4 receptora. Svaka od tri molekule ATP-a veže se na veznu čeljust formiranu između svake od dvije podjedinice u izvanstaničnoj domeni. Svaka podjedinica je prikazana u drugoj boji (preuzeto iz: Kawate, 2017).

U klasičnom izvanstaničnom prostoru ATP postoji u dva oblika, kao slobodni ion ( $\text{ATP}^{4-}$ ) i kao kompleks s magnezijem ( $\text{MgATP}^{2-}$ ). Slobodni ion je agonist svih P2X receptora, dok kompleks s magnezijem može aktivirati samo P2X1 i P2X3 podtipove receptora. Aktivacija receptora počinje vezanjem ATP-a u procijep između podjedinica, takozvanu „veznu čeljust“, što uzrokuje zauzimanje neuobičajene tvorbe ATP-a u obliku slova U, prikazano na Slici 2.



Slika 2. Vezanjem na vezno mjesto na receptoru (tzv.“ veznu čeljust“) dolazi do zauzimanja neuobičajene tvorbe ATP-a u obliku slova U (preuzeto iz: Kawate, 2017).

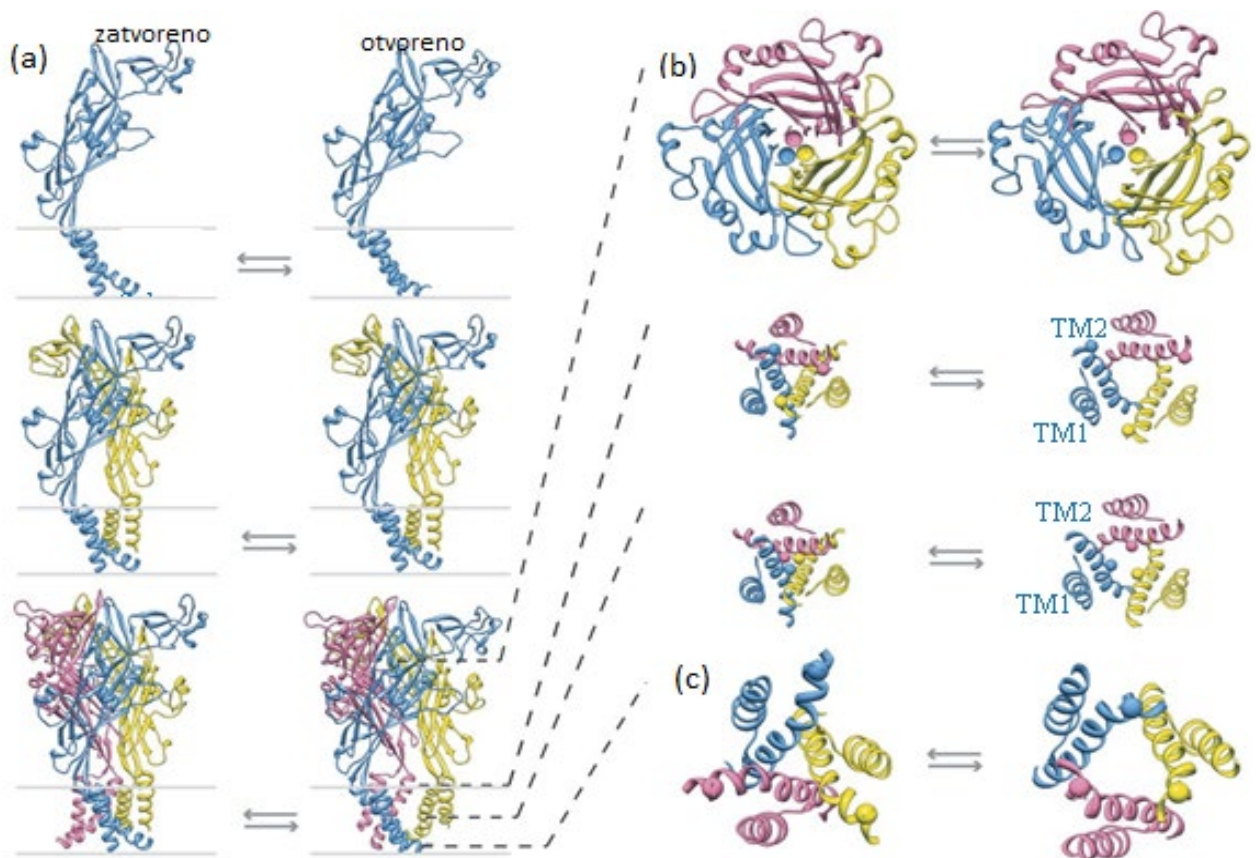
Podjedinice receptora možemo usporediti sa slikom dupina, pri čemu izvanstaničnu domenu dijelimo na glavu, gornji i donji dio tijela, te desnu, lijevu i leđnu peraju (Slika 3.).



Slika 3. Usporedba podjedinice receptora sa slikom dupina. Izvanstanična domena podijeljena je na glavu (H, *engl.* head), gornji (UB, *engl.* upper body) i donji (LB, *engl.* lower body) dio tijela, te desnu, lijevu i leđnu peraju (RF, *engl.* right flipper; LF, *engl.* left flipper; DF, *engl.* dorsal fin) (preuzeto iz: Kawate, 2017).

Vežanje ATP-a na vežno mjesto dovodi do niza konformacijskih promjena izvanstanične domene. H domena se nakon vežanja ATP-a pomiče prema DF domeni čime se ona zakreće prema gore, a time se LF domena od nje udaljava i rezultat je zatvaranje vezne čeljusti.

Vežanje jedne molekule ATP-a nije dovoljno za aktivaciju receptora, ali uzrokuje stabilizaciju susjednih podjedinica čime se olakšava vežanje iduće molekule. Vežanje dvije ili više molekula je dovoljno za aktivaciju receptora. Receptor ima 6 transmembranskih uzvojnica, po 2 od svake podjedinice. Kanal, tj. poru za prolaz iona, čine 3 uzvojnice svake podjedinice, dok ih ostala 3 okružuju. Sam kanal nalazi se u unutrašnjosti fosfolipidnog dvosloja na mjestu gdje se križaju 3 uzvojnice. Oni su postavljeni pod kutom i imaju oblik pješčanog sata. Kako bi kroz kanal mogli prolaziti ioni potrebno je da se on proširi na širinu veću od iona koji kroz njega prolaze. Vežanje ATP-a uzrokuje rotaciju uzvojnica za  $15^\circ$  u smjeru suprotnom od kazaljke na satu, a rotacija dovodi do vertikalnog izduživanja uzvojnica koje više nisu pod kutom kao u stanju mirovanja. To uzrokuje širenje kanala kroz kojeg sada ioni mogu prolaziti (Slika 4.) (Kawate, 2017).



Slika 4. Struktura P2X receptora, mjesto vežanja ATP-a i širenje kanala (a) Sklop P2X2 receptora iz tri podjedinice, prikazane u zatvorenom (lijevo) i otvorenom (desno) stanju.

Gornji, srednji i donji prikaz pokazuju redom jednu, dvije i tri podjedinice. (b) Poprečni presjeci otvorenih i zatvorenih P2X2 receptora štakora na razini različitih atoma, gledani odozgo. (c) Poprečni presjek receptora gledan odozdo (preuzeto iz: North, 2016).

P2X receptori su neselektivni kationski kanali čijim otvaranjem dolazi do ulaska kalcijevih i natrijevih iona u stanicu, dok kalijevi ioni izlaze iz stanice što dovodi do aktivacije NLRP3 inflammasoma u makrofagima i dendritičkim stanicama (Karmakar i sur., 2016).

NLRP3 inflammasom je komponenta urođene imunosti koja djeluje kao receptor koji prepoznaje određeni obrazac (PRR, *engl.* pattern-recognition receptor). Sastoji se od senzorne molekule NLR receptora, adaptacijskog proteina nalik mrljicama povezanog s apoptozom koji sadrži domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza (ASC, *engl.* apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain) te prokaspaze 1. Aktivacija inflammasoma potaknuta molekulskim obrascima povezanim s patogenima (PAMP, *engl.* pathogen-associated molecular pattern) ili DAMP molekulama dovodi do izlučivanja upalnih citokina IL-1 $\beta$  i IL-18 koje potiče kaspaza-1 te do piroptoze, tj. upalne programirane stanične smrti (Yang i sur., 2019). IL-1 $\beta$  je jedan od važnih regulatora urođenog i stečenog imunskog odgovora i potiče oslobađanje drugih upalnih citokina, primjerice transformirajućeg čimbenika rasta beta (TGF- $\beta$ , *engl.* transforming growth factor beta), te dovodi do povećanja vaskularne permeabilnosti. To doprinosi odlaganju kolagena i stvaranju fibroze u plućima. NLRP3 inflammasom igra važnu ulogu kod KOPB-a, astme te općenito kod upalnih reakcija u plućima (Zheng i sur., 2018).

**P2Y** receptori su transmembranski receptori za izvanstanične nukleotide povezani s G-proteinom. Razlikujemo 8 podtipova (P2Y1/2/4/6/11/12/13/14R), a gotovo sve ljudske stanice ih eksprimiraju. Imaju brojne fiziološke i patofiziološke uloge, a jedna od najvažnijih je agregacija trombocita u kojoj posreduju P2Y1 i P2Y12 receptori, a inducirana je ADP-om. P2Y receptori imaju i bitnu ulogu u živčanom sustavu budući da adeninski nukleotidi sudjeluju u regulaciji neurona (Von Kügelgen i Hoffmann, 2016).

Što se tiče uloge u imunskom odgovoru, najznačajniji receptor je P2Y2 koji se, za razliku od P2X7R, može aktivirati ATP-om i UTP-om. Uloga mu je usmjeravanje neutrofila i pojačavanje kemotaksijskih signala, što znači da izvanstanični ATP može djelovati i kao autokrini i kao parakrini glasnik. Istraživanja su pokazala da P2Y2R kojeg aktivira eATP dodatno potiče oslobađanje ATP-a iz paneksinskih kanala, što posljedično dovodi do

aktivacije P2X7R. Taj proces je istražen samo kod virusnih i bakterijskih infekcija te infekcija protozoama, ali bi bilo zanimljivo da se takva koordinacija receptora istraži i kod drugih stanja u kojima je potreban odgovor imunskog sustava zbog upalnih reakcija (Hlapčić i sur., 2019.)

Receptori se mogu podijeliti u dvije podporodice s obzirom na provođenje signala i strukturne sličnosti. Prva podporodica sastoji se od P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 i P2Y11 receptora i za njih je karakteristično povezivanje s Gq-proteinima što stimulira fosfolipazu C i dovodi do povećanja koncentracije inozitol-fosfata i mobilizacije kalcijevih iona iz unutarstaničnih skladišta. P2Y11R se povezuju i s Gs-proteinom što dovodi do porasta aktivnosti adenilat-ciklaze. Druga podporodica receptora, u koju ubrajamo P2Y12, P2Y13 i P2Y14, provodi signale prvenstveno preko aktivacije Gi-proteina i inhibicije aktivnosti adenilat-ciklaze (Von Kügelgen i Hoffmann 2016).

P2Y2R se sastoji od 377 aminokiselina koje su organizirane u 7 transmembranskih domena. C-kraj receptora se nalazi unutar stanice, dok mu je N-kraj izvanstanični. Hidrofobne transmembranske domene povezane su s 3 izvanstanične petlje (EL, *engl.* extracellular loop) i 3 unutarstanične petlje. EL2 i EL3 iz vanjske domene receptora sadrže 2 cisteina koji tvore disulfidnu vezu potrebnu za aktivaciju receptora. Nakon aktivacije, unutarstanični C-kraj povezan s G-proteinom dovodi do različitih fizioloških odgovora. Mjesta fosforilacije na P2Y2 receptoru nalaze se na unutarstaničnom C-kraju.

Receptori se u potpunosti aktiviraju ATP-om i UTP-om koji su njegovi prirodni agonisti, dok su ADP i UDP slabiji agonisti. Aktivacija receptora dovodi do izlučivanja kloridnih iona i inhibira apsorpciju natrija u epitelnim stanicama. Istovremeno se potiče sekrecija vode i lučenje mucina u dišnim putovima i epitelu oka, što je povezano s bolestima oka i pluća. P2Y2 potiče vaskularnu upalu i aterosklerozu zbog povećanja endotelne ekspresije vaskularnog adhezijskog proteina 1 (VCAM-1, *engl.* vascular cell adhesion molecule 1) te vazodilataciju jer posreduje u otpuštanju dušikovog oksida (NO), a to ukazuje da receptor igra ulogu u krvožilnim bolestima. Također, može dovesti do aktivacije citosolne fosfolipaze čime dolazi do stvaranja prekursora prostaglandina, eikozanoida i leukotriena. P2Y2R eksprimiran na neutrofilima regulira njihovu degradaciju koju inducira fibrinogen što pokazuje da ima ulogu u zacjeljivanju rana. Općenito, P2Y2R i njegovi signalni putovi predstavljaju potencijalnu farmakološku metu kod upale, ateroskleroze, cistične fibroze, bolesti oka, neurodegeneracijskih bolesti i brojnih drugih stanja i bolesti (Xu i sur., 2018).

### 4.2.3. Uloga eATP-a u KOPB-u

Mehanizam upalnog odgovora kod KOPB-a izuzetno je kompleksan i tek dijelom razjašnjen, a uzrokovan je mnogobrojnim međusobno povezanim čimbenicima. Kako bi se razjasnila patofiziološka podloga ove bolesti potrebna su daljnja istraživanja. Uz ostalo, bilo bi važno temeljito istražiti ulogu izvanstaničnog ATP-a u KOPB-u budući da je eATP DAMP molekula što znači da djeluje kao signal oštećenja te potiče aktivaciju imunskog sustava.

Upalna reakcija u plućima pacijenata s KOPB-om može biti uzrokovana različitim štetnim česticama, međutim dim cigareta se smatra najčešćim rizičnim čimbenikom za razvoj bolesti pa se u istraživanjima u obzir uzima i značaj pušenja. Njegov utjecaj ispitan je na mišjem modelu pri čemu se inducirala akutna plućna upala i emfizem pomoću duhanskog dima što je rezultiralo povećanjem koncentracije eATP-a u BAL-u miševa (Lucattelli i sur., 2011).

Utjecaj pušenja ispitan je i na humanim uzorcima, pri čemu su neutrofili izolirani iz krvi zdravih nepušača stimulirani duhanskim dimom. Mjerenje koncentracije eATP-a u BAL-u pokazalo je porast u usporedbi s nestimuliranim neutrofilima (Mortaz i sur., 2009).

Istraživanja su pokazala da su pacijenti s KOPB-om skloni upalnom odgovoru ukoliko je prisutna povišena razina eATP-a u dišnim putovima, te da eATP doprinosi pogoršanju bronhokonstrikcije i kašlja.

Istraživanje provedeno na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu daje saznanja o koncentraciji eATP-a u ovisnosti o pušenju i GOLD klasifikaciji. U ispitivanju su korišteni uzorci plazme prikupljeni u epruvete s K<sub>3</sub>-etilendiamintetraoctenom kiselinom (K<sub>3</sub>-EDTA) kao antikoagulantom, a sakupljeni su na Klinici za plućne bolesti Jordanovac (Zagreb).

Istraživanje pokazuje da su koncentracije eATP-a značajno povišene kod pacijenata s KOPB-om u usporedbi s kontrolnim skupinama koje čine pušači i nepušači. Također je ustanovljeno da su koncentracije eATP-a više kod zdravih pušača u usporedbi sa zdravim nepušačima, te kod pacijenata s KOPB-om u odnosu na obje kontrolne skupine. Primijećene su i različite koncentracije eATP-a među pacijentima iz različitih GOLD stadija. Također je uočeno da njegova koncentracija značajno raste s porastom težine simptoma, pa se tako značajno razlikuju vrijednosti eATP-a među pacijentima iz GOLD A, B i D skupina.

U istraživanju je ispitana i razina mRNA ekspresije dva eATP receptora u krvi te je uočeno da je razina ekspresije za *P2X7R* slična kod kontrolne skupine i pacijenata s KOPB-om, dok je



razina ekspresije za *P2Y2R* dvostruko veća kod pacijenata u odnosu na kontrolnu skupinu (Hlapčić i sur., 2019).

### 4.3. Hsp70

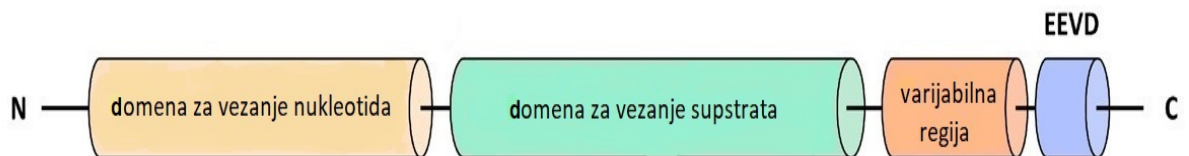
Proteini toplinskoga šoka (Hsp, *engl.* heat shock proteins) su velika skupina proteina čija je uloga olakšavanje smatanja proteina te održavanje njihove strukture i funkcije, a njihova ekspresija je inducirana toplinskim šokom ili drugim vrstama stresa. S obzirom na molekulsku težinu podijeljeni su u nekoliko većih skupina, a to su mali Hsp, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp110. Svi su ovisni o ATP-u i imaju aktivnost ATP-aze, osim skupine malih Hsp-ova. Članovi različitih porodica ovih proteina sudjeluju u staničnoj signalizaciji i reguliranju različitih staničnih funkcija, a Hsp70 i Hsp90 su najviše istraženi (Wu i sur., 2017; Pockley i Henderson, 2018).

Hsp70 su ubikvitarni molekularni šaperoni veličine oko 70 kilodaltona (kDa) koji su ključni za održavanje homeostaze proteina. Sudjeluju u brojnim procesima važnim za normalno funkcioniranje stanice, kao što su smatanje novosintetiziranih proteina, translokacija polipeptida u mitohondrije, kloroplaste i endoplazmatski retikulum, razgradnja proteinskih kompleksa te regulacija aktivnosti proteina. Također, sprječavaju agregaciju i potiču preslagivanje pogrešno nabranih denaturiranih proteina, solubiliziraju proteinske agregate te surađuju sa staničnim mehanizmima degradacije kako bi uklonili one proteine čija se struktura ne može popraviti. Štite stanicu od proteotoksičnog stresa, starenja organizma te patofizioloških stanja koja narušavaju homeostazu proteina. S obzirom na bitnu ulogu u nabiranju proteina, podrazumijeva se da Hsp70 djeluju na širok raspon supstrata kako bi prilagodili svoje brojne aktivnosti različitim i promjenjivim uvjetima u stanici.

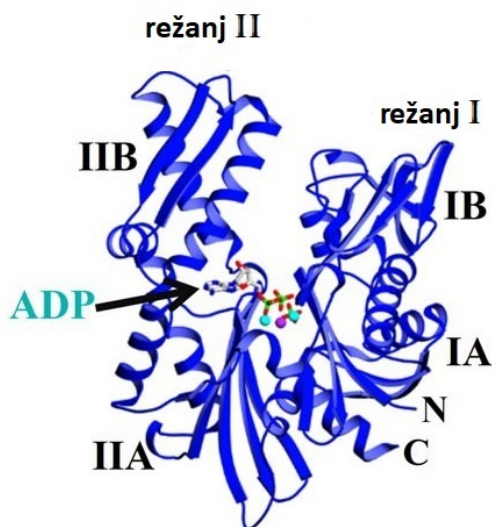
#### 4.3.1. Struktura i funkcija

Hsp70 proteini imaju zajedničku strukturu (Slika 5.) koja se sastoji od domene koja veže nukleotid (NBD, *engl.* nucleotide binding domain) od 44 kDa, čija je uloga vezanje i hidroliza ATP-a, domene koja veže supstrat (SBD, *engl.* substrate binding domain) od 28 kDa, čija je uloga vezanje polipeptida te središnje domene osjetljive na proteaze. NBD ima nabor koji se sastoji od četiri poddomene (IA, IB, IIA i IIB) raspoređene u dva reznja koja su odvojena dubokim procijepom (Slika 6.). U katalitičkom središtu na dnu ovog dubokog procijepa ATP koordinira sve četiri poddomene kontrolirajući pokrete reznjeva. SBD je podijeljena na dva dijela, SBD $\alpha$ , koji djeluje kao heliksni poklopac, i SBD $\beta$ , koji je izgrađen od osmolančanog  $\beta$  sendviča. Kada nukleotid nije vezan, SBD $\alpha$  se približi prema SBD $\beta$  kako bi se zatvorila centralna šupljina. Eukariotski citosolni Hsp70 sadrži očuvani nabijeni motiv (Glu-Glu-Val-Asp) na varijabilnom C-kraju koji služi za vezanje košaperona i drugih Hsp-ova. Funkcija

različitih Hsp70 ovisi o lokalizaciji unutar stanice, a uloga im je zaštita stanice od smrtonosnog oštećenja izazvanog stresom. Hsp70 su snažni antiapoptozni proteini i blokiraju apoptozu na različitim razinama. S jedne strane, sprječavaju permeabilizaciju mitohondrijske membrane i oslobađanje apoptotičkih čimbenika, a s druge strane inhibiraju sklapanje signalnog kompleksa koji inducira smrt (Radons, 2016.; Rosenzweig i sur., 2019).



Slika 5. Shematski prikaz zajedničke strukture Hsp70 koja se sastoji od domene za vezanje nukleotida, domene za vezanje supstrata, varijabilne regije te očuvanog nabijenog motiva, tj. EEVD (Glu-Glu-Val-Asp) (preuzeto iz: Radons, 2016).



Slika 6. Izolirana struktura domene koja veže nukleotid (NBD, *engl.* nucleotide binding domain) u kompleksu s ADP-om iz goveđeg proteina toplinskoga šoka 70 (preuzeto iz: Liu i sur., 2019).

### 4.3.2. Izvanstanični Hsp70

Kad se Hsp70 nađe izvan stanice djeluje kao DAMP i šalje signal opasnosti imunom sustavu. Djeluje upalno i potiče aktivaciju urođenog imunostanog sustava vezanjem za specifične receptore. Također može aktivirati i stečeni imunostani sustav tako što veže antigenske peptide i predstavlja ih antigen-prezentirajućim stanicama. Hsp70 se može oslobađati iz stanica pasivno, tijekom lize stanice ili nekroze i aktivno (Hlapčić i sur., 2020.).

Mehanizam izlaska Hsp70 iz stanice nije u potpunosti poznat, ali obuhvaća nekoliko predloženih putova. Većina Hsp proteina se sintetizira u citosolu te transportira u izvanstanični prostor. Budući da ovim proteinima nedostaje signal potreban za sekreciju klasičnim aktivnim transportom preko endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata, oni se transportiraju alternativnim mehanizmima. Jedan od predloženih načina transporta je preko lizosoma i endosoma. U ovom procesu se Hsp70 translocira unutar lizosoma pomoću transportnog sustava koji veže ATP (ABC, *engl.* ATP-binding cassette transport-like system) gdje je zaštićen od degradacije i transportiran iz stanice procesom endocitoze. Nylandsted i suradnici su uočili prisutnost Hsp70 unutar lizosoma što potvrđuje ovu teoriju (Nylandsted i sur., 2004). Drugi način izlaska iz stanice je umetanje proteina u membranu vezikule predviđene za izlazak iz stanice (De Maio, 2011). Istraživanja pokazuju da Hsp70 ima sposobnost induciranja agregacije liposoma u ovisnosti o vremenu, koncentraciji i nukleotidima (Arispe i sur., 2002). Također je dokazano da je specifičnost Hsp-ova prema lipidima značajno povezana s prisutnošću fosfatidilserina unutar membrane. Novija istraživanja pokazuju da prisutnost nekih drugih lipida, kao što je primjerice kolesterol, mogu dodatno poticati umetanje Hsp70 u membranu. Nasuprot tome, kod membrana koje sadrže fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ili fosfatidilinozitol ne dolazi do umetanja Hsp70 i agregacije liposoma, što dovodi do zaključka da je fosfatidilserin nužan za umetanje ovog proteina u membranu. Stabilnost Hsp70 unutar membrane je značajna, ako se uzima u obzir da je to protein koji ne sadrži hidrofobnu domenu koja bi objasnila umetanje u fosfolipidni dvosloj. Točan mehanizam umetanja nije poznat, a pretpostavlja se da je povezan s fluidnošću membrane (De Maio, 2011).

Stanice u uvjetima stresa izlučuju specifične vezikule koje sadrže različite molekule, poput Hsp70, čiju ekspresiju inducira stres. Te izvanstanične vezikule prepoznaju različiti tipovi stanica, posebice stanice imunostanog sustava, kao dio procjene stresnih uvjeta. Određene komponente vezikula mogu djelovati kao signali koji aktiviraju preventivni odgovor u

udaljenim stanicama, a pretpostavlja se da specifičan stanični odgovor ovisi o sastavu vezikula. Izvanstanične vezikule imaju različite biološke funkcije, primjerice vezikule koje sadrže Hsp70 na svojoj površini mogu snažno i specifično aktivirati makrofage. Također, takve vezikule stimuliraju citotoksičnost prirodnih stanica ubojica (NK, *engl.* natural killer cells). Moguće je da Hsp70 ima različite uloge ovisno o sastavu i izvoru vezikule te o staničnoj meti. Nije poznat mehanizam kojim ciljne stanice prepoznaju vezikule, ali se pretpostavlja da je prepoznavanje temeljeno na postojanju površinskih signala. Jedna mogućnost je da izvanstanične vezikule gube lipidnu asimetriju karakterističnu za staničnu membranu te izlažu fosfatidilserin na svojoj površini, a makrofagi prepoznaju ovu vezikulu pomoću površinskih receptora koji prepoznaju fosfatidilserin. Druga mogućnost je da receptori na ciljnim stanicama specifično prepoznaju neku od molekula na površini vezikula. Primjeri takvih receptora su receptori slični Tollu (TLR, *engl.* Toll-like receptors) 2 i 4, CD14, CD91 i CD40 koji specifično prepoznaju Hsp70 (De Maio, 2011).

#### **4.3.3. Receptori i unutarstanični signalni putovi**

Receptori TLR su transmembranski glikoproteini tipa 1, sastavljeni od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene. Izvanstanična domena karakterizirana je motivom bogatim leucinima i odgovorna je za vezanje liganada (Werling i sur., 2009). Jednom prolaze kroz staničnu membranu, tj. imaju jednu transmembransku domenu. Unutarstanična domena vrlo je slična citoplazmatskoj domeni Toll receptora u *Drosophila* muhe i IL-1 receptora što upućuje na istovjetno molekularno signaliziranje (Muzio i Mantovani, 2001).

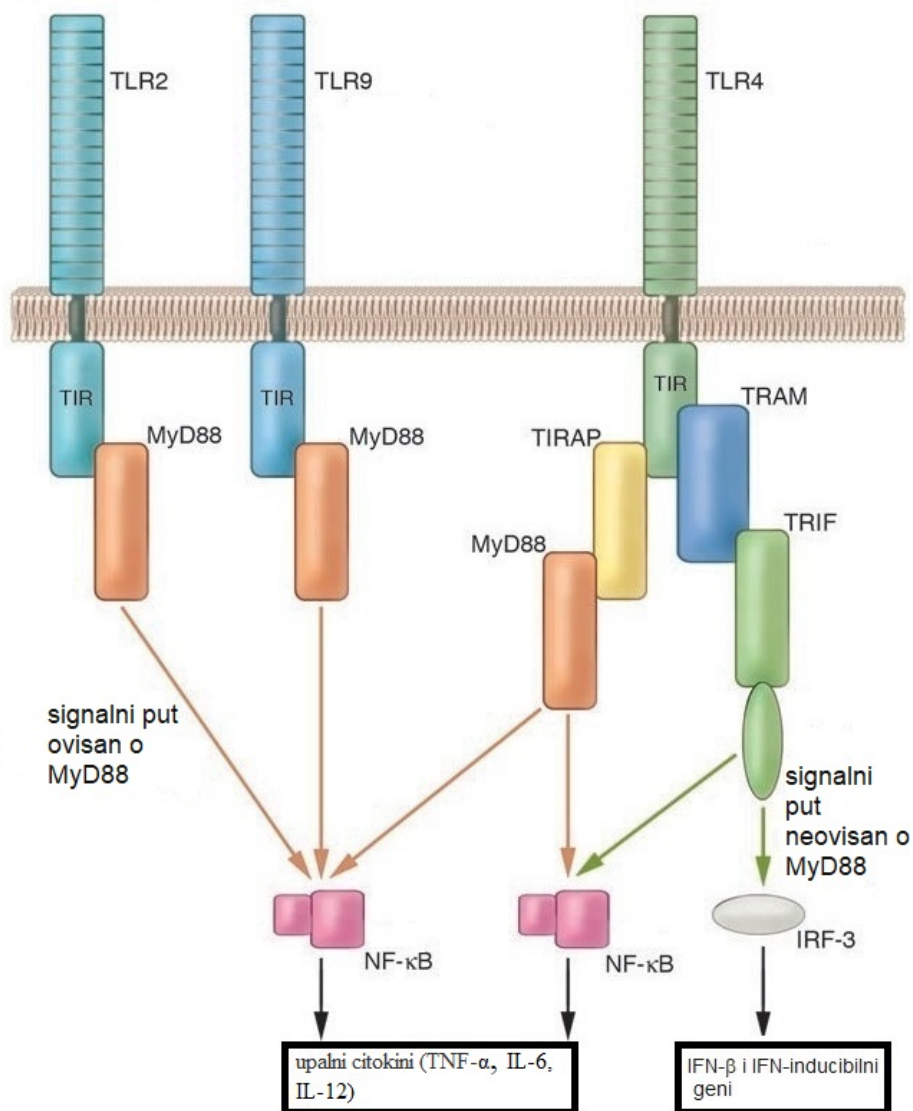
TLR ubrajamo u PRR-ove. Igraju važnu ulogu u urođenom imunosnom sustavu koji omogućuje trenutni obrambeni mehanizam prilikom prodora antigena dok stečeni imunosni sustav ne pokrene odgovor specifičan za pojedini antigen. Ekspimirani su na stanicama urođene imunosti kao što su makrofagi, neutrofil, dendritičke stanice, NK stanice, mastociti, bazofili i eozinofili, a mogu prepoznati PAMP-ove i DAMP-ove. Aktivacijom receptora pokreće se signalna kaskada kao obrambeni mehanizam s ciljem popravljivanja oštećenog tkiva što dovodi do oslobađanja upalnih citokina i imunomodulatora (El Zayat i sur., 2019).

Nakon vezivanja liganada na receptor potiče se dimerizacija receptora, što dovodi do aktivacije adaptacijskih proteina povezanih s unutarstaničnom domenom homolognom Tollu i receptoru za IL-1 (TIR, *engl.* Toll/interleukin 1 receptor homology domain), što pokreće signalizacijsku kaskadu. Važne su studije u kojima se istražuje struktura kompleksa TLR i liganada jer bi

podaci o strukturi mogli omogućiti bolje razumijevanje urođene imunosti i potencijalno dizajniranje novih lijekova (Werling i sur., 2009).

Aktivacijom TIR domene pokreće se signalni put u kojem sudjeluju specifični adaptacijski proteini poput proteina mijeloidne diferencijacije 88 (MyD88, *engl.* myeloid differentiation primary response 88), adaptacijskog proteina sličnog MyD88 (MAL, *engl.* MyD88 adapter-like), adaptacijskog proteina povezanog s TIR domenom (TIRAP, *engl.* TIR domain-containing adapter protein), adaptacijskog proteina s TIR domenom koji inducira interferon  $\beta$  (TRIF, *engl.* TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ ) i adaptacijske molekule povezane s TRIF-om (TRAM, *engl.* TRIF related adaptor molecule). TLR signalni putovi mogu biti ovisni i neovisni o MyD88. Većina TLR-ova zahtijeva MyD88, ali TLR4 može prenositi signale koristeći alternativne adaptacijske proteine, kao što su TRAM i TRIF (Slika 7.).

Signalna kaskada se preko adaptacijskih molekula nastavlja aktivacijom protein-kinaze povezane s receptorom za interleukin-1 (IRAK, *engl.* interleukin-1 receptor-associated protein kinases) 1, 2, 4 i M te čimbenika 6 povezanog s receptorom za TNF (TRAF, *engl.* TNF receptor-associated factor) što dovodi do translokacije upalnih transkripcijskih faktora jezgrinog čimbenika kappa B (NF- $\kappa$ B, *engl.* nuclear factor kappa B), aktivacijskog proteina 1 (AP1, *engl.* activator protein 1) i čimbenika 3 regulacije interferona (IRF3, *engl.* interferon regulatory factor 3) u jezgru. Svaki transkripcijski faktor je zadužen za transkripciju specifičnih gena koji kodiraju različite upalne citokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6), interferone tipa 1 (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ), kemokine (CXCL8 i CXCL10) te antimikrobne peptide. Iako TLR igraju važnu ulogu u obrani organizma od patogena, sinteza upalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  ima različite učinke na organizam jer utječu na fiziološke procese i usmjeravaju metabolizam prema kataboličkim reakcijama (Werling i sur., 2009.; El-Zayat i sur., 2019).



Slika 7. TLR signalni putovi ovisni i neovisni o MyD88. Većina TLR-ova zahtijeva MyD88. Međutim, TLR4 može prenositi signale koristeći alternativne adaptacijske proteine, kao što su TRAM i TRIF. (IFN - interferon, IL – interleukin, IRF3 - čimbenik 3 regulacije interferona, MyD88 - protein mijeloidne diferencijacije 88, NF-κB - jezgrin čimbenik kappa B, TIR - domena homologna Tollu i receptoru za interleukin-1, TIRAP - adaptacijski protein povezan s TIR domenom, TLR - receptor sličan Tollu, TNF - čimbenik nekroze tumora, TRAM - adaptacijska molekula povezana s TRIF-om, TRIF - adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β) (preuzeto iz: Doherty i Arditi, 2004).

#### 4.3.4. Uloga izvanstaničnog Hsp70 (eHsp70) u KOPB-u

S obzirom da Hsp70 izvan stanice djeluje kao DAMP te aktivira imunski sustav, njegova uloga proučavana je kod različitih bolesti, uključujući respiracijske bolesti, pa je tako utvrđena njegova povišena koncentracija u plazmi pacijenata koji boluju od astme u usporedbi sa zdravim osobama (Hou i sur., 2011). Točno djelovanje eHsp70 nije utvrđeno, međutim pronađena je povezanost s KOPB-om. Cui i suradnici su određivali koncentracije Hsp70 iz plazme radnika u rudnicima, te su povezali njegovu povišenu koncentraciju s povećanim rizikom od razvoja KOPB-a (Cui i sur., 2015).

Istraživanja pokazuju povišene koncentracije eHsp70 u sputumu pacijenata oboljelih od KOPB-a u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima (Huang i sur., 2019). Osim toga, povećana ekspresija Hsp70 na razini mRNA i proteina utvrđena je u plućnom tkivu oboljelih (Dong i sur., 2013). Također je istraženo djelovanje rekombinantnog humanog Hsp70 (rhHsp70) na humanim monocitima i bronhalnim epitelnim staničnim modelima. Rezultati eksperimenta su pokazali da rhHsp70 sam, a i u kombinaciji s cigaretnim dimom, utječe na aktivaciju unutarstaničnih signalnih putova koji dovode do sinteze upalnih citokina (Hulina-Tomašković i sur., 2019).

Hlapčić i suradnici proveli su istraživanje u kojem su određivali koncentraciju eHsp70 iz uzoraka plazme bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika, te su ispitivali njezinu povezanost s karakteristikama bolesti definiranim spirometrijom i kliničkom slikom. Istraživanje je potvrdilo povezanost eHsp70 i parametara koji odražavaju opstrukciju protoka zraka, pušački status, simptome i povijest egzacerbacija, a koji su važni u procjeni stanja pacijenata.

Utvrđena je povišena koncentracija eHsp70 kod pacijenata s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima, a najviše koncentracije su prisutne kod pacijenata iz GOLD 4 stadija i iz GOLD D skupine. Također su utvrđene povišene koncentracije eHsp70 kod pacijenata iz GOLD 2 stadija i GOLD A skupine u usporedbi sa zdravim ispitanicima. S obzirom da su potvrđene različite koncentracije eHsp70 kod različitih GOLD stadija i skupina, određivanje njegove koncentracije moglo bi olakšati klasifikaciju pacijenata prema GOLD smjernicama. Daljnja istraživanja mogla bi potvrditi i proširiti ova saznanja. Također, istraživanje je uzimalo u obzir i pušački status, te su pacijenti koji pripadaju podskupinama GOLD 2 i GOLD A imali više razine eHsp70 nego zdravi nepušači, ali slične razine kao pušači s normalnom funkcijom pluća. To može ukazivati da bi zdravi pušači mogli biti podložniji promijenjenim upalnim odgovorima uzrokovanim eHsp70, a neki od njih bi potencijalno



mogli i razviti KOPB, što bi se također moglo potvrditi daljnjim istraživanjima (Hlapčić i sur., 2020).

## 5. ZAKLJUČCI

- Dijagnostika KOPB-a je manjkava i ograničena. Od razvoja bolesti do pojave prvih simptoma prođe izvjestan vremenski period u kojem dolazi do strukturnih promjena plućnog tkiva, a u trenutku postavljanja dijagnoze plućna funkcija je najčešće već značajno oštećena. Potrebno je razviti nove dijagnostičke metode koje će omogućiti postavljanje dijagnoze u ranijim fazama bolesti kako bi se usporila progresija bolesti i olakšalo liječenje.
- Terapija KOPB-a može omogućiti smirivanje simptoma bolesti, ali ne može dovesti do izlječenja, što znači da pacijenti terapiju uzimaju doživotno. S obzirom da pacijenti moraju živjeti uz simptome bolesti, uzimati farmakološku terapiju te promijeniti životni stil, kvaliteta života im je znatno narušena. U budućnosti se očekuje porast broja oboljelih što podrazumijeva porast smrtnih ishoda, kao i povećanje troškova liječenja.
- Poznati su nam brojni faktori koji doprinose razvoju KOPB-a, od genskih do okolišnih, ali sam mehanizam strukturnih promjena i oštećenja zbog pojačanog upalnog odgovora je zahtijevan i slojevit te nedovoljno istražen. Nove spoznaje o dosad neidentificiranim i/ili nedovoljno istraženim patofiziološkim mehanizmima ove bolesti mogle bi dovesti do napretka u dijagnostici i liječenju.
- Istraživanja potvrđuju povezanost izvanstaničnih ATP-a i Hsp70 s KOPB-om. Zabilježene su njihove povećane koncentracije u pacijenata s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Privlače pažnju znanstvenika zbog njihove potencijalne uloge kao biomarkera koji bi mogli omogućiti ranije postavljanje dijagnoze i lakšu klasifikaciju pacijenata prema GOLD smjernicama. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ovi rezultati potvrdili, te dosadašnja saznanja još više proširila.
- Zbog činjenice da su izvanstanični ATP i izvanstanični Hsp70 DAMP molekule koje aktiviraju imunski sustav, spoznaje o njihovom djelovanju i prisutnosti mogle bi imati značaj i za brojne druge bolesti u kojima dolazi do aktivacije imunskog sustava, a informacije o njihovim signalnim putovima mogle bi poslužiti u otkrivanju novih terapijskih meta.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

### 6.1. Popis kratica

AAT	$\alpha$ 1-antitripsin
AATD	deficijencija $\alpha$ -1 antitripsina ( <i>engl.</i> alpha-1 antitrypsin deficiency)
ABC	transportni sustav koji veže ATP ( <i>engl.</i> ATP-binding cassette transport-like system)
ADP	adenozin-difosfat
AMP	adenozin-monofosfat
AP1	aktivacijski protein 1 ( <i>engl.</i> activator protein 1)
ASC	protein nalik mrljicama povezan s apoptozom koji sadrži domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza ( <i>engl.</i> apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain)
ATP	adenozin-trifosfat
BAL	bronhoalveolarni lavat
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
CAT	test za procjenu KOPB-a ( <i>engl.</i> COPD Assesment Test)
CD	biljeg diferencijacije ( <i>engl.</i> cluster of differentiation)
CD39	ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaza 1; biljeg diferencijacije 39 ( <i>engl.</i> cluster of differentiation 39)
CD73	5'-nukleotidaza; biljeg diferencijacije 73 ( <i>engl.</i> cluster of differentiation 73)
CRP	C-reaktivni protein
CT	računalna tomografija ( <i>engl.</i> computed tomography)
CXCL1	ligand 1 s C-X-C motivom ( <i>engl.</i> C-X-C motif ligand 1)
DAMP	molekulski obrazac povezan s oštećenjem ( <i>engl.</i> danger-associated molecular pattern)
DF	leđna peraja ( <i>engl.</i> dorsal fin)
eATP	izvanstanični adenzin-trifosfat ( <i>engl.</i> extracellular adenosine triphosphate)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
eHsp70	izvanstanični Hsp70 ( <i>engl.</i> extracellular Hsp70)
EL	izvanstanična petlja ( <i>engl.</i> extracellular loop)
FEV <sub>1</sub>	forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi ( <i>engl.</i> forced expiratory volume in one second)
FVC	forsirani vitalni kapacitet ( <i>engl.</i> forced vital capacity)

GOLD	Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest ( <i>engl.</i> Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
H	glava ( <i>engl.</i> head)
Hsp	protein toplinskoga šoka ( <i>engl.</i> heat shock protein)
Hsp70	protein toplinskoga šoka veličine oko 70 kDa ( <i>engl.</i> heat shock protein)
IFN	interferon
IL	interleukin
IRAK	protein-kinaza povezana s receptorom za interleukin-1 ( <i>engl.</i> interleukin-1 receptor-associated protein kinases)
IRF3	čimbenik 3 regulacije interferona ( <i>engl.</i> interferon regulatory factor 3)
kDa	kilodalton
KOPB	kronična opstruktivna plućna bolest
LABA	dugodjelujući beta-agonist ( <i>engl.</i> long-acting beta-agonist)
LAMA	dugodjelujući muskarinski antagonist ( <i>engl.</i> long-acting muscarinic antagonist)
LB	donji dio tijela ( <i>engl.</i> lower body)
LF	lijeva peraja ( <i>engl.</i> left flipper)
MAL	adaptacijski protein sličan MyD88 ( <i>engl.</i> MyD88 adapter-like)
MCP1	monocitni kemotaksijski protein 1 ( <i>engl.</i> monocyte chemotactic protein 1)
MMP	matriksna metaloproteinaza ( <i>engl.</i> matrix metalloproteinase)
mMRC	modificirana skala zaduhe ( <i>engl.</i> Modified British Medical Research Council Questionnaire)
MyD88	protein mijeloidne diferencijacije 88 ( <i>engl.</i> myeloid differentiation primary response 88)
NBD	domena koja veže nukleotid ( <i>engl.</i> nucleotide binding domain)
NF- $\kappa$ B	jezgrin čimbenik kappa B ( <i>engl.</i> nuclear factor kappa B)
NK	prirodne stanice ubojice ( <i>engl.</i> natural killer cells)
NLR	receptori slični NOD-u ( <i>engl.</i> NOD-like receptors)
NLRP3	NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 ( <i>engl.</i> NOD-like receptor pyrin 3)
NO	dušikov oksid
NOD	oligomerizacijska domena koja veže nukleotide ( <i>engl.</i> nucleotide-binding oligomerisation domain)

PAMP	molekulski obrazac povezan s patogenima ( <i>engl.</i> pathogen-associated molecular pattern)
PRR	receptor koji prepoznaje određeni obrazac ( <i>engl.</i> pattern recognition receptor)
RF	desna peraja ( <i>engl.</i> right flipper)
rhHsp70	rekombinantni humani Hsp70
SABA	kratkodjelujući beta-agonist ( <i>engl.</i> short-acting beta-agonist)
SAMA	kratkodjelujući muskarinski antagonist ( <i>engl.</i> short-acting muscarinic antagonist)
SBD	domena koja veže supstrat ( <i>engl.</i> substrate binding domain)
TGF- $\beta$	transformirajući čimbenik rasta beta ( <i>engl.</i> transforming growth factor beta)
TIR	domena homologna Tollu i receptoru za interleukin-1 ( <i>engl.</i> Toll/interleukin 1 receptor homology domain)
TIRAP	adaptacijski protein povezan s TIR domenom ( <i>engl.</i> TIR domain-containing adapter protein)
TLR	receptor sličan Tollu ( <i>engl.</i> Toll-like receptor)
TNF- $\alpha$	čimbenik nekroze tumora $\alpha$ ( <i>engl.</i> tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRAF	čimbenik povezan s receptorom za TNF ( <i>engl.</i> TNF receptor-associated factor)
TRAM	adaptacijska molekula povezana s TRIF-om ( <i>engl.</i> TRIF related adaptor molecule)
TRIF	adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon $\beta$ ( <i>engl.</i> TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$ )
UB	gornji dio tijela ( <i>engl.</i> upper body)
UDP	uridin-difosfat
UTP	uridin-trifosfat
VCAM-1	vaskularni adhezijski protein 1 ( <i>engl.</i> vascular cell adhesion molecule 1)

## 7. LITERATURA

Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papana A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I; Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015, 5, 020415.

Arispe N, Doh M, De Maio A. Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70. *Cell Stress Chaperones*. 2002, 7, 330-8.

Brunton, L.L., Lazo, J.S., & Parker, K.L. The Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (11th edition). New York, McGraw-Hill, 2005, str. 720-722, 730-731.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 2021., [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)), pristupljeno 25. 11. 2021.

Cui X, Xing J, Liu Y, Zhou Y, Luo X, Zhang Z, Han W, Wu T, Chen W. COPD and levels of Hsp70 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) in plasma and lymphocytes among coal workers: a case-control study. *Cell Stress Chaperones*. 2015, 20, 473-81.

De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. *Cell Stress Chaperones*. 2011, 16, 235-49.

Di Virgilio F, Vuerich M. Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci*. 2015, 191, 117-23.

Doherty TM, Arditi M. TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest*. 2004, 114, 1699-703.

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.

Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, Dale N, Raemdonck K, Wong S, Catley MC, Belvisi MG, Birrell MA. P2X7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One.* 2011, 6(9): e24097

El-Zayat, S. R., Sibaii, H., & Mannaa, F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent.* 2019, 43, 1-12.

Fernández-Fernández MR, Valpuesta JM. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. *F1000 Fac Rev.* 2018, 7, 1497.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2022., [www.goldcopd.org](http://www.goldcopd.org), pristupljeno 10. 2. 2022.

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.

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.

Hou C., Zhao H., Li W., Liang Z., Zhang D., Liu L., Tang W., Cai S., Zou F. Increased heat shock protein 70 levels in induced sputum and plasma correlate with severity of asthma

patients. *Cell Stress Chaperones* 2011, 16, 663–671.

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, 1-9.

Hulina-Tomašković A, Hejjink 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.* 2019, 156, 47-58.

Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR, Pearlman E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in response to ATP. *Nat Commun.* 2016, 7, 10555.

Kawate T. P2X Receptor Activation. *Adv Exp Med Biol.* 2017, 1051, 55-69.

Land WG. Use of DAMPs and SAMPs as Therapeutic Targets or Therapeutics: A Note of Caution. *Mol Diagn Ther.* 2020, 24, 251-262.

Liu Q, Liang C, Zhou L. Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system. *Protein Sci.* 2020, 29, 378-390.

Lu HH, Zeng HH, Chen Y. Early chronic obstructive pulmonary disease: A new perspective. *Chronic Dis Transl Med.* 2021, 7, 79-87.

Lucattelli M, Cicko S, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, Sundas W, Grimm M, Zeiser R, Dürk T, Zissel G, Sorichter S, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC, Lungarella G, Idzko M. P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung



inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011, 44, 423-9.

Mortaz E, Braber S, Nazary M, Givi ME, Nijkamp FP, Folkerts G. ATP in the pathogenesis of lung emphysema. *Eur J Pharmacol.* 2009, 619, 92-6.

Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. *J Endotoxin Res.* 2001, 7, 297-300.

North RA. P2X receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016, 371, 20150427

Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, Weber E, Multhoff G, Rohde M, Jäättelä M. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med.* 2004, 200, 425-35.

Pockley AG, Henderson B. Extracellular cell stress (heat shock) proteins—immune responses and disease: an overview. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2018, 373, 20160522.

Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* 2016, 21, 379-404.

Rosenzweig R, Nillegoda NB, Mayer MP, Bukau B. The Hsp70 chaperone network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019, 20, 665-680.

Spurzem JR, Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med.* 2005, 26, 142-53.

Strnad P, McElvaney NG, Lomas DA. Alpha<sub>1</sub>-Antitrypsin Deficiency. *N Engl J Med.* 2020, 382, 1443-1455.

Stryer L, Berg J. M., Tymoczko J. L. Biochemistry (5th ed.), New York, W. H. Freeman, 2002, str. 570-571.

Thurlbeck WM, Müller NL. Emphysema: definition, imaging, and quantification. *AJR Am J Roentgenol.* 1994, 63, 1017-25.

Von Kügelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology.* 2016, 104, 50-61.

Werling D, Jann OC, Offord V, Glass EJ, Coffey TJ. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol.* 2009, 30, 124-30.

Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2017, 38, 226-256.

Xu P, Feng X, Luan H, Wang J, Ge R, Li Z, Bian J. Current knowledge on the nucleotide agonists for the P2Y<sub>2</sub> receptor. *Bioorg Med Chem.* 2018, 26, 366-375.

Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 2019, 10, 128.

Zheng R, Tao L, Jian H, Chang Y, Cheng Y, Feng Y, Zhang H. NLRP3 inflammasome activation and lung fibrosis caused by airborne fine particulate matter. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018, 163, 612-619.

Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ Jr, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest*. 2000, 106, 1081-93.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Kronična opstruktivska plućna bolest je treći vodeći uzrok smrtnosti u svijetu i time predstavlja veliki izazov moderne medicine. Svjetska zdravstvena organizacija pretpostavlja značajan porast broja oboljelih u budućnosti zbog povećane prisutnosti rizičnih čimbenika, od kojih su najznačajniji aktivno i pasivno pušenje te onečišćenje zraka. Unatoč velikoj prevalenciji, dijagnostika i liječenje su još uvijek nedostatni. Velik broj oboljelih nema postavljenu dijagnozu, dijelom zbog nedovoljne edukacije samog pacijenta koji simptome ne prepoznaje, a dijelom zbog nedovoljnih dijagnostičkih metoda. Liječenje može smanjiti simptome i spriječiti buduće egzacerbacije, ali ne može dovesti do izlječenja. Pacijenti koji boluju od KOPB-a imaju značajno narušenu kvalitetu života, a troškovi liječenja predstavljaju problem i pacijentima i zdravstvenom sustavu. Kako bi se omogućila pravovremena dijagnostika i postigli bolji ishodi liječenja, potrebno je identificirati i razjasniti patofiziološke mehanizme bolesti koji su trenutno kompleksni i nepoznati.

Cilj ovog diplomskog rada je napraviti pregled dostupnih podataka o KOPB-u te izvanstaničnom ATP-u i izvanstaničnom Hsp70 kao potencijalnim biomarkerima. eATP i eHsp70 su molekule koje, kad se nalaze izvan stanice, djeluju kao molekularni obrasci povezani s oštećenjem. Imaju važnu ulogu u upalnim procesima kod različitih bolesti, pa tako i KOPB-a, a dosadašnja istraživanja potvrđuju njihovu povezanost s KOPB-om. Zabilježene su njihove povećane koncentracije u pacijenata s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Daljnja istraživanja mogla bi potvrditi njihovu ulogu kao potencijalnih biomarkera koji omogućuju raniju dijagnozu bolesti i olakšavaju klasifikaciju pacijenata prema GOLD smjernicama. Saznanja o njihovom točnom djelovanju i signalnim putovima mogla bi dovesti do razvoja novih dijagnostičkih metoda ili otkrivanja novih terapijskih meta, a time i do uspješnijeg liječenja i smanjenja mortaliteta.

Chronic obstructive pulmonary disease is the third leading cause of death in the world and thus represents a major challenge for modern medicine. The World Health Organization assumes a significant increase in the number of patients in the future due to the increased presence of risk factors, the most significant of which are active and passive smoking and air pollution. Despite the high prevalence, diagnosis and treatment are still insufficient. A large number of patients have not been diagnosed, partly due to insufficient education of the patients who do not recognize the symptoms, and partly due to insufficient diagnostic methods. Treatment can reduce symptoms and prevent future exacerbations, but it cannot cure the disease. Patients suffering from COPD have a significantly impaired quality of life, and the cost of treatment is a problem for both patients and the health care system. In order to enable timely diagnosis and achieve better treatment outcomes, it is necessary to identify and clarify the pathophysiological mechanisms of the disease that are currently complex and unknown.

The aim of this thesis is to review the available data on COPD and extracellular ATP as well as extracellular Hsp70 as potential biomarkers. eATP and eHsp70 are molecules that, when present outside the cell, act as danger-associated molecular patterns. They play an important role in inflammatory processes in various diseases, including COPD, and previous research confirms their association with COPD. Their increased concentrations have been reported in patients with COPD compared to healthy subjects. Further research could confirm their role as potential biomarkers that might enable earlier diagnosis of the disease and might facilitate the classification of patients according to the GOLD guidelines. Knowledge of their exact action and signalling pathways could lead to the development of new diagnostic methods or the discovery of new therapeutic targets, and thus to more successful treatment and reduced mortality.

## **9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### ULOGA IZVANSTANIČNIH ADENOZIN-TRIFOSFATA I PROTEINA TOPLINSKOGA ŠOKA 70 U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI

Matea Tomljanović

#### SAŽETAK

Kronična opstruktivna plućna bolest je treći vodeći uzrok smrtnosti u svijetu i time predstavlja veliki izazov moderne medicine. Svjetska zdravstvena organizacija pretpostavlja značajan porast broja oboljelih u budućnosti zbog povećane prisutnosti rizičnih čimbenika, od kojih su najznačajniji aktivno i pasivno pušenje te onečišćenje zraka. Unatoč velikoj prevalenciji, dijagnostika i liječenje su još uvijek nedostatni. Velik broj oboljelih nema postavljenu dijagnozu, dijelom zbog nedovoljne edukacije samog pacijenta koji simptome ne prepoznaje, a dijelom zbog nedovoljnih dijagnostičkih metoda. Liječenje može smanjiti simptome i spriječiti buduće egzacerbacije, ali ne može dovesti do izlječenja. Pacijenti koji boluju od KOPB-a imaju značajno narušenu kvalitetu života, a troškovi liječenja predstavljaju problem i pacijentima i zdravstvenom sustavu. Kako bi se omogućila pravovremena dijagnostika i postigli bolji ishodi liječenja, potrebno je identificirati i razjasniti patofiziološke mehanizme bolesti koji su trenutno kompleksni i nepoznati. Cilj ovog diplomskog rada je napraviti pregled dostupnih podataka o KOPB-u te izvanstaničnom ATP-u i izvanstaničnom Hsp70 kao potencijalnim biomarkerima. eATP i eHsp70 su molekule koje, kad se nalaze izvan stanice, djeluju kao molekulski obrasci povezani s oštećenjem. Imaju važnu ulogu u upalnim procesima kod različitih bolesti, pa tako i KOPB-a, a dosadašnja istraživanja potvrđuju njihovu povezanost s KOPB-om. Zabilježene su njihove povećane koncentracije u pacijenata s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Daljnja istraživanja mogla bi potvrditi njihovu ulogu kao potencijalnih biomarkera koji omogućuju raniju dijagnozu bolesti i olakšavaju klasifikaciju pacijenata prema GOLD smjernicama. Saznanja o njihovom točnom djelovanju i signalnim putovima mogla bi dovesti do razvoja novih dijagnostičkih metoda ili otkrivanja novih terapijskih meta, a time i do uspješnijeg liječenja i smanjenja mortaliteta.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 7 grafičkih prikaza, 2 tablice i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ATP, Hsp70, KOPB, P2X, P2Y, TLR

Mentor: **Dr. sc. Lada Rumora**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lada Rumora**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Lidiya Bach Rojcky**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: 24. 03. 2022.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### ROLE OF EXTRACELLULAR ADENOSINE-TRIPHOSPHATE AND HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Matea Tomljanović

#### SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease is the third leading cause of death in the world and thus represents a major challenge for modern medicine. The World Health Organization assumes a significant increase in the number of patients in the future due to the increased presence of risk factors, the most significant of which are active and passive smoking and air pollution. Despite the high prevalence, diagnosis and treatment are still insufficient. A large number of patients have not been diagnosed, partly due to insufficient education of the patients who do not recognize the symptoms, and partly due to insufficient diagnostic methods. Treatment can reduce symptoms and prevent future exacerbations, but it cannot cure the disease. Patients suffering from COPD have a significantly impaired quality of life, and the cost of treatment is a problem for both patients and the health care system. In order to enable timely diagnosis and achieve better treatment outcomes, it is necessary to identify and clarify the pathophysiological mechanisms of the disease that are currently complex and unknown.

The aim of this thesis is to review the available data on COPD and extracellular ATP as well as extracellular Hsp70 as potential biomarkers. eATP and eHsp70 are molecules that, when present outside the cell, act as danger-associated molecular patterns. They play an important role in inflammatory processes in various diseases, including COPD, and previous research confirms their association with COPD. Increased concentrations have been reported in patients with COPD compared to healthy subjects. Further research could confirm their role as potential biomarkers that enable earlier diagnosis of the disease and facilitate the classification of patients according to the GOLD guidelines. Knowledge of their exact action and signalling pathways could lead to the development of new diagnostic methods or the discovery of new therapeutic targets, and thus to more successful treatment and reduced mortality.

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

Thesis includes: 42 pages, 7 figures, 2 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ATP, Hsp70, COPD, P2X, P2Y, TLR

Mentor: **Lada Rumora, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lada Rumora, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lidija Bach Rojckey, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: 24. 03. 2022.