Molekularni mehanizmi patogeneze kronične opstrukcijske plućne bolesti

Somborac Bačura, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:038359

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO - BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANITA SOMBORAC BAČURA

MOLEKULARNI MEHANIZMI PATOGENEZE KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE BOLESTI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

ANITA SOMBORAC BAČURA

MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO - BIOKEMIJSKI FAKULTET

ANITA SOMBORAC BAČURA

MOLEKULARNI MEHANIZMI PATOGENEZE KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE BOLESTI

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Tihana Žanić Grubišić

Zagreb, 2013.

University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

ANITA SOMBORAC BAČURA

MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Tihana Žanić Grubišić, Ph.D.

Zagreb, 2013

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i manjim dijelom na University Medical Center Groningen, Groningen, Nizozemska, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u sklopu projekta “Molekularni mehanizmi patogeneze kronične opstrukcijske bolesti pluća” Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske (006-0061245-0977).

Srdačno zahvaljujem prof. dr. sc. Tihani Žanić Grubišić, mojoj mentorici, na predloženoj temi, stručnom vodstvu, idejama, savjetima, prenesenom znanju i ukazanom povjerenju tijekom cjelokupnog moga rada na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju.

Posebnu zahvalnost iskazujem prof. dr. sc. Antoonu van Oosterhoutu i dr. sc. Marcu van der Toornu, koji su me prihvatili kao ravnopravnog člana svoga laboratorija na University Medical Center Groningen u Nizozemskoj, na konstruktivnim kritikama i raspravama te pruženoj pomoći i prijateljstvu.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ivani Čepelak na idejama i stručnoj potpori koju mi je pružila tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr. sc. Ladi Rumora osobito se zahvaljujem na suradnji i nesebičnoj pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada.

Dr. sc. Mariji Grdić Rajković, dr. sc. Mireli Matokanović, Vesni Boričević i Suzani Hrajnik hvala na uvijek prisutnoj prijateljskoj podršci, dobrodošlim savjetima i tehničkoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala doc. dr. sc. Sanji Popović Grle, mr. sc. Vlasti Zovko, dr. sc. Vanji Radišić Biljak i mr. sc. Dolores Pancirov na pomoći oko prikupljanja i laboratorijskoj analizi uzoraka krvi bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika.

Prof. dr. sc. Jadranki Varljen, dr. sc. Dijani Detel i Sunčici Buljević zahvaljujem na pomoći oko određivanja aktivnosti DPPIV u serumu.

Dr. sc. Ruđeru Novaku hvala na pomoći oko analize načina umiranja stanica na protočnom citometru.

Dr. sc. Dubravki Rašić zahvaljujem na određivanju MDA na HPLC-u.

Diplomanticama Ivani Miletić, Doris Goleš, Marini Habuš, Ines Meštrić i Martini Vukelić hvala na pomoći oko izvođenja dijela ekperimenata.

Svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju zahvaljujem na suradnji i prijateljstvu.

Najveća hvala mom suprugu Matku i mojoj obitelji na pruženoj podršci, ljubavi i beskrajnom razumijevanju tijekom svih godina uloženih u izradu ove disertacije.

SAŽETAK

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) najučestalija je kronična respiracijska bolest s progresivnim tijekom. Temeljni uzroci KOPB-a uključuju pušenje cigareta, čimbenike okoline te gensku predispoziciju. Dosadašnje spoznaje o razvoju upale, oksidacijskom stresu i neravnoteži proteaza i antiproteaza nisu dostatne za objašnjenje nastanka i progresije bolesti.

Ovo istraživanje pokazalo je da ekstrakt dima cigareta u A549 alveolarnim epitelnim stanicama uzrokuje oksidacijska oštećenja staničnih lipida i proteina, što bi moglo voditi do gubitka važnih funkcija stanice, rezultirajući smrću stanice. Nakupljanje oštećenih proteina u stanicama vodi do aktivacije ER stresnog odgovora u vidu povećanja razine fosforiliranog eIF2α i smanjenja *de novo* sinteze proteina. Smanjena sinteza proteina vjerojatno pridonosi povećanju koncentracije slobodnih aminokiselina unutar stanica zajedno s razgradnjom proteina oštećenih dimom cigareta putem ubikvitin-proteasomalnog sustava. Iako se ER stresni odgovor obično povezuje s povećanom aktivnosti proteasoma, dim cigareta uzrokuje značajno smanjenje kaspazne, tripsinske i kimotripsinske aktivnosti proteasoma, što ih čini nedovoljno učinkovitima u procesu uklanjanja oštećenih proteina.

Kao dio staničnog odgovora na stres dolazi i do porasta ekspresije šaperonskih proteina HSP32 i HSP27, što nismo pokazali i za HSP70. Također dolazi do promjena u MAPK signalnim putovima: značajno raste razina aktivirane p38, ne dolazi do aktivacije ERK, a aktivaciju JNK nismo uspjeli detektirati.

Nadalje, rezultati su pokazali da A549 stanice ne sadrže MMP-9, ali pod utjecajem ekstrakta dima cigareta s vremenom u medij pojačano otpuštaju MMP-2, a TIMP-1 otpuštaju u manjoj količini, što bi moglo pridonijeti ukupnoj neravnoteži proteaza i antiproteaza.

U bazalnim uvjetima polimorfonuklearni leukociti (PMN) bolesnika s KOPB-om otpuštaju značajno više MMP-9 u odnosu na zdrave kontrole. Stimulacijom PMN zdravih kontrola ekstraktom dima cigareta povećava se otpuštanje MMP-9, dok ista stimulacija u bolesnika s KOPB-om ne izaziva dodatno povećanje visoke razine otpuštanja MMP-9, što dokazuje kroničnu aktivaciju PMN bolesnika i njihovu moguću ulogu u razgradnji izvanstaničnog matriksa u plućima.

Sistemska neravnoteža proteaza i antiproteaza u bolesnika s KOPB-om očituje se povećanom koncentracijom MMP-9 u plazmi. Analiza ROC krivulja pokazala je vrlo dobru dijagnostičku točnost za koncentraciju MMP-9, što je čini dobrim biljegom za razlikovanje bolesnika i zdravih osoba. Ispitivanje učestalosti polimorfizama *MMP9* gena (-1562 C/T i $(CA)_n$ dinukleotidna ponavljanja u promotorskoj regiji te Q279R u egzonu 6) pokazalo je da nema značajnih razlika između bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika, kao niti povezanosti koncentracije MMP-9 s genotipovima ispitanika.

U serumu bolesnika s KOPB-om, kod kojih je dokazana sistemska upala (povećani ukupni leukociti, neutrofili i CRP), nalazimo smanjenu aktivnost DPPIV, proteaze koja bi mogla pridonositi razvoju upale. S obzirom na dokazanu vrlo dobru dijagnostičku točnost, ovaj enzim bi se također mogao koristiti kao učinkovit biokemijski pokazatelj KOPB-a.

Ključne riječi: kronična opstrukcijska plućna bolest, epitel, dim cigareta, ER stres, ubikvitin-proteasomalni sustav, HSP, MAPK, MMP-9, TIMP-1, DPPIV

SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the most common chronic respiratory disease with a progressive course. The principal causes of COPD include cigarette smoking, environmental factors and genetic predisposition. Current knowledge about the development of inflammation, oxidative stress and protease-antiprotease imbalance is not sufficient to explain the origin and progression of the disease.

In this study we found that cigarette smoke extract causes oxidative damage to cellular lipids and proteins in A549 alveolar epithelial cells, which could lead to the loss of important cell functions, eventually resulting in cell death. The accumulation of damaged proteins in cells leads to the activation of ER stress response in the form of increased levels of phosphorylated eIF2α and reduced *de novo* protein synthesis. It is likely that reduced protein synthesis contributes to the increase in the level of free amino acids in the cells, together with the degradation of proteins damaged by cigarette smoke inside the ubiquitin-proteasome system. ER stress response is usually associated with increased proteasomal activity; however, cigarette smoke causes a significant reduction in caspase-, trypsin- and chymotrypsin-proteasomal activities, making the proteasome inefficient in the process of removing damaged proteins.

As a part of the cellular stress response, we observed an increase in the expression of chaperone proteins HSP32 and HSP27, which was not shown for HSP70. Likewise, we noticed the changes in MAPK signaling pathways: a significant increase in the level of activated p38, no activation of ERK and undetectable activation of JNK.

Furthermore, the results showed that A549 cells do not produce MMP-9, but after a while treatment with the cigarette smoke extract increases the release of MMP-2 in the medium and decreases the release of TIMP-1, which probably contributes to the overall protease-antiprotease imbalance.

In basal conditions polymorphonuclear leukocytes (PMN) of patients with COPD release significantly much more MMP-9 compared to healthy controls. Stimulation of PMN of healthy controls with cigarette smoke extract increases the release of MMP-9, while in patients with COPD no further increase over the high secretion rate was found, suggesting the chronic activation of PMN of patients with COPD and their possible role in the degradation of extracellular matrix in the lungs.

Systemic protease-antiprotease imbalance in plasma of patients with COPD is manifested by increased concentration of MMP-9. ROC curve analysis showed a very good diagnostic accuracy for concentration of MMP-9, making it a good biomarker for distinguishing patients from healthy individuals. Testing the frequency of *MMP9* gene polymorphisms (-1562 C/T and $(CA)_n$ dinucleotide repeat in the promoter region, and Q279R in exon 6) showed no significant difference between patients with COPD and healthy subjects, and no correlation of MMP-9 concentration with subjects' genotypes.

In sera of patients with COPD, with the observed systemic inflammation (increased total leukocytes, neutrophils and CRP), we found a decrease in activity of DPPIV, a protease that could be contributing to the development of inflammation. As showing a very good diagnostic accuracy, this enzyme could also be used as an effective biochemical marker of COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, epithelium, cigarette smoke, ER stress, ubiquitin-proteasome system, HSP, MAPK, MMP-9, TIMP-1, DPPIV

SADRŽAJ

1. UVOD.....1
1.1. KRONIČNA OPSTRUKCIJSKA PLUĆNA BOLEST (KOPB).....2
1.1.1. Dijagnoza i klasifikacija bolesti.....3
1.1.2. Klinički oblici bolesti.....6
1.1.3. Oštećenja alveolarnih stanica uzrokovana dimom cigareta.....7
1.2. MEHANIZMI PATOGENEZE KOPB-a.....8
1.2.1. Upalna reakcija.....8
1.2.2. Oksidacijski stres.....10
1.2.3. Neravnoteža proteaza i antiproteaza.....12
1.2.4. Apoptoza.....14
1.3. REGULACIJSKI PROTEINI I ENZIMSKI SUSTAVI U PATOGENEZI KOPB-a.....17
1.3.1. Stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres) 17
1.3.1.1. Biokemijske promjene u ER stresu.....17
1.3.1.2. ER stres i KOPB.....19
1.3.2. Ubikvitin-proteasomalni sustav.....20
1.3.2.1. Razgradnja proteina putem proteasoma.....21
1.3.2.2. Ubikvitin-proteasomalni sustav i KOPB.....22
1.3.3. Proteini toplinskog šoka (HSP) 22
1.3.3.1. Biokemijska uloga HSP.....22
1.3.3.2. HSP i KOPB.....25
1.3.4. Proteinske kinaze aktivirane mitogenima (MAPK) 25
1.3.4.1. ERK signalni put.....26
1.3.4.2. JNK signalni put.....27
1.3.4.3. p38 signalni put.....28
1.3.4.4. MAPK i KOPB.....28
1.3.5. Metaloproteinaze matriksa (MMP) 29
1.3.5.1. Metaloproteinaza matriksa-9 (MMP-9) 30
1.3.5.2. MMP-9 i KOPB.....36
1.3.6. Dipeptidil peptidaza IV (DPPIV) 36
1.3.6.1. DPPIV i kronična upala.....37
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....38
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....41
3.1. *IN VITRO* ISPITIVANJA.....42
3.1.1. Stanična linija ljudskih alveolarnih epitelnih stanica A549.....42
3.1.1.1. Presađivanje stanica.....43
3.1.1.2. Određivanje broja stanica.....43
3.1.2. Izravno izlaganje stanica dimu cigareta.....44
3.1.3. Izlaganje stanica ekstraktu dima cigareta.....44
3.1.4. Priprema lizata stanica.....45
3.1.4.1. Priprema lizata stanica sonikacijom.....45
3.1.4.2. Priprema lizata stanica za elektroforezu u SDS-poliakrilamidnom gelu i Western blot analize.....46
3.1.5. Određivanje koncentracije proteina u lizatima stanica.....46
3.1.6. Određivanje vijabilnosti stanica MTT testom.....46
3.1.7. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze u mediju iznad stanica.....47
3.1.8. Određivanje apoptoze / nekroze protočnom citometrijom.....48
3.1.9. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina.....49

3.1.10. Određivanje koncentracije malondialdehida.....50
3.1.11. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu.....51
3.1.12. Western blot analiza.....51
3.1.13. Mjerenje *de novo* sinteze proteina.....55
3.1.14. Određivanje slobodnih aminokiselina tekućinskom kromatogafijom - spektrometrijom masa (LC/MS) 56
3.1.15. Detekcija aktivnih mjesta na podjedinicama proteasoma.....57
3.1.16. Mjerenje aktivnosti proteasoma.....57
3.1.17. Određivanje koncentracije MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 u lizatima i mediju iznad A549 stanica.....58
3.1.18. Statistička obrada podataka dobivenih u *in vitro* ispitivanjima.....59
3.2. ISPITANICI.....60
3.2.1. Bolesnici s KOPB-om.....60
3.2.2. Zdravi ispitanici.....61
3.2.3. Uzorci.....61
3.2.4. Određivanje koncentracije upalnih biljega.....61
3.2.5. Izolacija polimorfonuklearnih leukocita.....61
3.2.6. Izlaganje polimorfonuklearnih leukocita ekstraktu dima cigareta.....62
3.2.7. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH u mediju iznad polimorfonuklearnih leukocita izloženih ekstraktu dima cigareta.....62
3.2.8. Određivanje koncentracije MMP-9 i TIMP-1 u mediju iznad polimorfonuklearnih leukocita izloženih ekstraktu dima cigareta.....62
3.2.9. Određivanje koncentracije MMP-9 i TIMP-1 u plazmi.....63
3.2.10. Izolacija DNA.....63
3.2.11. Određivanje koncentracije DNA i provjera čistoće.....64
3.2.12. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....64
3.2.13. Elektroforeza umnoženih fragmenata DNA u agaroznom gelu.....67
3.2.14. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP).....67
3.2.15. Elektroforeza RFLP produkata u agaroznom gelu.....69
3.2.16. Fragmentarna analiza na automatskom sekvenceru.....70
3.2.17. Određivanje katalitičke aktivnosti DPPIV u serumu.....71
3.2.18. Statistička obrada podataka dobivenih u uzorcima ispitanika.....71
4. REZULTATI.....72
4.1. ISPITIVANJE UTJECAJA DIMA CIGARETA NA ALVEOLARNE EPITELNE STANICE A549.....73
4.1.1. Standardizacija ekstrakta dima cigareta.....73
4.1.2. Citotoksičnost ekstrakta dima cigareta prema A549 stanicama.....74
4.1.2.1. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na vijabilnost A549 stanica (MTT test).....74
4.1.2.2. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje LDH u medij iznad A459 stanica.....76
4.1.2.3. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na način umiranja A549 stanica.....78
4.1.3. Razvoj oksidacijskog stresa u A549 stanicama izloženim ekstraktu dima cigareta.....80
4.1.3.1. Ekstrakt dima cigareta povećava koncentraciju malondialdehida u A549 stanicama.....80
4.1.3.2. Ekstrakt dima cigareta smanjuje koncentraciju slobodnih tiolnih skupina proteina u A549 stanicama.....82
4.1.4. Utjecaj dima cigareta na razgradnju oštećenih proteina u A549 stanicama.....83
4.1.4.1. Dim cigareta uzrokuje nakupljanje ubikvitin-proteinskih konjugata u A549 stanicama.....83
4.1.4.2. Razvoj ER stresa pod utjecajem dima cigareta u A549 stanicama.....85
4.1.4.3. Dim cigareta smanjuje *de novo* sintezu proteina u A549 stanicama.....86

4.1.4.4. Dim cigareta povećava koncentraciju slobodnih aminokiselina u A549 stanicama....87
4.1.4.5. Dim cigareta smanjuje aktivnost proteasoma u A549 stanicama.....88
4.1.4.5.1. Utjecaj dima cigareta na aktivna mjesta proteasoma u A549 stanicama.....88
4.1.4.5.2. Utjecaj dima cigareta na aktivnost proteasoma u A549 stanicama.....90
4.1.5. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na ekspresiju HSP u A549 stanicama.....92
4.1.6. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na ekspresiju i aktivaciju MAPK u A549 stanicama....97
4.1.7. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 u medij iznad A459 stanica.....103
4.2. ISPITIVANJA PROVEDENA NA BOLESNICIMA S KOPB-om I ZDRAVIM ISPITANICIMA.....106
4.2.1. Kliničke i demografske karakteristike ispitanika.....106
4.2.2. Biljezi upale u ispitivanim skupinama.....107
4.2.3. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na polimorfonuklearne leukocite.....108
4.2.3.1. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje LDH u medij iznad polimorfonuklearnih leukocita.....108
4.2.3.2. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje MMP-9 i TIMP-1 u medij iznad polimorfonuklearnih leukocita.....109
4.2.4. Dijagnostička vrijednost određivanja koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u plazmi.....111
4.2.5. Određivanje polimorfizama *MMP9* gena.....115
4.2.5.1. Umnožavanje fragmenata DNA koji sadrže polimorfna mjesta PCR metodom.....115
4.2.5.2. Određivanje genotipova RFLP metodom.....117
4.2.5.3. Određivanje genotipova metodom fragmentarne analize na automatskom sekvenceru.....118
4.2.5.4. Učestalost genotipova *MMP9* gena u ispitivanim skupinama.....120
4.2.5.5. Učestalost alela *MMP9* gena u ispitivanim skupinama.....120
4.2.5.6. Koncentracija MMP-9 u plazmi ispitanika i genotipovi *MMP9* gena.....121
4.2.6. Dijagnostička vrijednost određivanja katalitičke aktivnosti DPPIV u serumu.....123
5. RASPRAVA.....127
5.1. *IN VITRO* MODEL ZA KOPB.....128
5.2. RAZVOJ APOPTOZE I NEKROZE POD UTJECAJEM DIMA CIGARETA.....129
5.3. OKSIDACIJSKA OŠTEĆENJA UZROKOVANA DIMOM CIGARETA.....130
5.4. DIM CIGARETA IZAZIVA ER STRESNI ODGOVOR I POREMEĆAJ FUNKCIJE PROTEASOMA.....132
5.5. PROMJENE U RAZINI EKSPRESIJE HSP POD UTJECAJEM DIMA CIGARETA.....135
5.6. AKTIVACIJA MAPK SIGNALNIH PUTOVA POD UTJECAJEM DIMA CIGARETA.....137
5.7. NERAVNOTEŽA PROTEAZA I ANTIPROTEAZA KAO UZROK POJAČANOG RAZARANJA PLUĆNOG PARENHIMA.....138
5.8. DPPIV KAO POTENCIJALNI NOVI BILJEG KOPB-a.....145
5.9. ZAVRŠNA RAZMATRANJA.....147
6. ZAKLJUČCI.....148
7. POPIS LITERATURE.....152
8. PRILOZI.....174
PRILOG A: Popis kratica.....175
PRILOG B: Rezultati sekvenciranja uzoraka DNA.....179
PRILOG C: Znanstveni radovi autorice zastupljeni u Current Contents bazi.....182
9. ŽIVOTOPIS.....199
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....203
BASIC DOCUMENTATION CARD.....204

1. UVOD

1.1. KRONIČNA OPSTRUKCIJSKA PLUĆNA BOLEST (KOPB)

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je učestala plućna bolest koju je moguće spriječiti i liječiti, a karakterizirana je stalnim ograničenjem protoka zraka koje je uglavnom progresivno, a povezano je s pojačanom kroničnom upalom dišnih putova i pluća izazvanom stranim česticama i plinovima. Udahnuti dim cigareta i ostale štetne tvari u plućima dovode do upale, uobičajenog odgovora koji je izmijenjen kod pojedinaca koji razvijaju KOPB. Takav kronični upalni odgovor može izazvati razaranje plućnog parenhima (rezultirajući emfizemom) i ometati normalni popravak i obrambene mehanizme (rezultirajući fibrozom malih dišnih putova). Ove patološke promjene dovode do progresivnog ograničenja protoka zraka, te naposlijetku do gubitka daha i ostalih simptoma karakterističnih za KOPB (www.goldcopd.org).

KOPB je jedan od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u svijetu, te predstavlja značajno i sve veće opterećenje za ekonomiju i društvo. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije 65 milijuna ljudi u svijetu boluje od umjerenog do teškog oblika KOPB-a (www.who.int), ali točan broj je teško ustanoviti jer mnogi slučajevi ostaju nedijagnosticirani (Willyard, 2012). Većina bolesnika s KOPB-om (80 %) su pušači. Međutim, samo 15 - 25 % pušača razvije bolest (Roth, 2008). KOPB je nekad bila češća bolest u muškaraca, ali zbog povećane uporabe duhana među ženama u zemljama s visokim dohotkom i veće izloženosti žena unutarnjem zagađenju zraka (nastalom gorenjem biomase u kućanstvima) u zemljama s niskim dohotkom, bolest danas gotovo podjednako pogađa muškarce i žene. U 2002. godini KOPB je bio peti vodeći uzrok smrti u svijetu. Predviđa se da će se ukupni broj smrtnih slučajeva kao posljedice KOPB-a povećati za više od 30 % u sljedećih 10 godina, osim ako se hitno ne poduzmu mjere za smanjenje temeljnih čimbenika rizika, posebno uporabe duhana. Procjene pokazuju da će KOPB 2030. godine postati treći vodeći uzrok smrti u svijetu (www.who.int). Kako bi se povećala svjesnost medicinskog osoblja i javnosti o ovoj bolesti, 1998. godine skupina znanstvenika osnovala je Globalnu inicijativu za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (eng. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*, GOLD). Njihovi glavni ciljevi su poboljšanje dijagnostike i učinkovitosti liječenja te prevencija bolesti, kako bi se smanjili morbiditet i mortalitet od KOPB-a (www.goldcopd.org).

Najčešći čimbenici rizika za razvoj KOPB-a su:

- duhanski dim porijeklom iz cigareta, lule, cigara i drugih vrsta duhanskih proizvoda, kao i duhanski dim iz okoline,
- unutarnje zagađenje zraka nastalo gorenjem biomase koja se koristi za kuhanje i grijanje u slabo ventiliranim stambenim prostorima (osobito pogađa žene u zemljama u razvoju),
- profesionalna prašina i kemikalije (isparavanja, nagrizajuće tvari, dimovi) pri jačoj ili duljoj izloženosti,
- vanjsko zagađenje zraka koje pridonosi ukupnosti udahnutih štetnih čestica, iako se čini da kao uzrok KOPB-a ima relativno mali učinak.

Budući da samo dio pojedinaca izloženih nabrojenim toksinima razvije KOPB, jasno je da su i drugi čimbenici rizika (poput genskih) uključeni u pojavnost bolesti. Od genskih čimbenika rizika osobito se ističe nasljedni manjak α_1-antitripsina (< 2 % svih oboljelih). Ostali čimbenici koji povećavaju rizik razvoja KOPB-a kod pojedinca su svi čimbenici koji utječu na razvoj pluća za vrijeme gestacije i djetinjstva (niska porođajna težina, respiracijske infekcije i slično) (www.goldcopd.org; Mocchegiani i sur., 2011; Roth, 2008).

Simptomi bolesti uključuju otežano disanje (dispneju), kronični kašalj i kronično stvaranje ispljuvka (sputuma). Osim toga, KOPB je multisistemska bolest koja počinje oštećenjem pluća, a razvojem dolazi do brojnih sistemskih manifestacija, kao što su sistemska upala, respiracijske infekcije, malnutricija i kardiovaskularne komplikacije. Egzacerbacije (periodi akutnog pogoršanja simptoma) se često pojavljuju u bolesnika i zajedno s komorbiditetima (pratećim bolestima, poput kardiovaskularnih bolesti, šećerne bolesti, gubitka mišićne mase, osteoporoze, depresije, raka pluća) pridonose ukupnoj težini bolesti kod pojedinih bolesnika (www.goldcopd.org; Decramer i sur., 2012; Pavičić i Jakopović, 2006).

1.1.1. Dijagnoza i klasifikacija bolesti

Klinička dijagnoza KOPB-a postavlja se na temelju rezultata spirometrije. Spirometriju se preporuča napraviti kod pojedinaca starijih od 40 godina ukoliko su prisutni simptomi poput otežanog disanja, kroničnog kašlja i kroničnog stvaranja ispljuvka, izloženost čimbenicima rizika ili KOPB u obitelji.

Spirometrija je jednostavan test funkcije pluća kojim se mjeri količina zraka koju osoba može izdahnuti i količina vremena potrebna da se to učini. Mjerenjem se dobivaju vrijednosti parametara potrebnih za postavljenje dijagnoze KOPB-a:

- **FEV_1** (forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi, eng. *forced expired volume in 1 second*): volumen zraka izdahnut tijekom prve sekunde nakon maksimalnog udaha i mjera je koliko brzo se pluća mogu isprazniti (ovisi o dobi, spolu, visini i etničkoj pripadnosti, pa ga je najbolje izraziti kao postotak predviđene normalne vrijednosti),
- **FVC** (forsirani vitalni kapacitet, eng. *forced vital capacity*): maksimalni volumen zraka izdahnut maksimalnom snagom,
- **FEV_1/FVC (Tiffeneauov indeks)**: odnos forsiranog izdisajnog volumena u prvoj sekundi prema forsiranom vitalnom kapacitetu daje klinički koristan pokazatelj ograničenja protoka zraka.

Zdrave odrasle osobe imaju omjer FEV_1/FVC između 0,70 i 0,80, dok vrijednost $FEV_1/FVC < 0,70$ nakon primjene bronhodilatatora potvrđuje postojanje ustrajnog ograničenja protoka zraka (www.goldcopd.org).

Prema rezultatima spirometrije ograničenje protoka zraka klasificira se u četiri GOLD stadija. Za sve GOLD stadije zajednički kriterij je omjer $FEV_1/FVC < 0,70$, dok se svrstavanje u podskupine temelji na predviđenom FEV_1 (nakon primjene bronhodilatatora):

- **GOLD I stadij** (blaga KOPB): $FEV_1 \geq 80$ % predviđenog,
- **GOLD II stadij** (umjerena KOPB): $50\ \% \leq FEV_1 < 80\ \%$ predviđenog,
- **GOLD III stadij** (teška KOPB): $30\ \% \leq FEV_1 < 50\ \%$ predviđenog,
- **GOLD IV stadij** (vrlo teška KOPB): $FEV_1 < 30\ \%$ predviđenog.

Prema najnovijim GOLD smjernicama, procjena težine KOPB-a, osim na rezultatima spirometrije, temelji se na prisustvu simptoma, riziku od egzacerbacija i prisustvu komorbiditeta. Procjena simptoma vrši se ispunjavanjem upitnika Izmijenjenog britanskog medicinskog istraživačkog vijeća (eng. *Modified British Medical Research Council*, mMRC), kojim se procjenjuje smanjenje sposobnosti bolesnika zbog nedostatka zraka, ili testa za procjenu KOPB-a (eng. *COPD Assessment Test*, CAT), koji uključuje još i učinak KOPB-a na svakodnevni život bolesnika. Procjena rizika od egzacerbacija temelji se na broju prethodno zabilježenih egzacerbacija, a čestim egzacerbacijama smatraju se one učestalije od dva puta

godišnje. Kombinacijom ovih parametara s rezultatima spirometrije, oboljeli od KOPB-a mogu se svrstati u četiri podskupine:

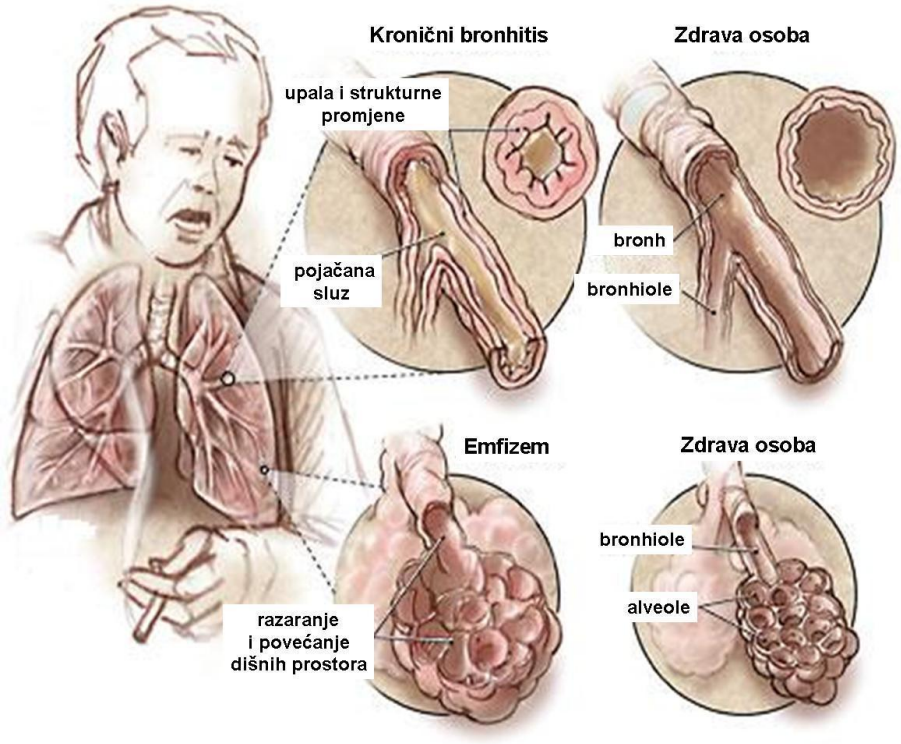
- **skupina A**: niski rizik od egzacerbacija, manje simptoma, obično GOLD 1 ili 2,
- **skupina B**: niski rizik od egzacerbacija, više simptoma, obično GOLD 1 ili 2,
- **skupina C**: visoki rizik od egzacerbacija, manje simptoma, obično GOLD 3 ili 4,
- **skupina D**: visoki rizik od egzacerbacija, više simptoma, obično GOLD 3 ili 4.

Ovakav pristup kombiniran s procjenom komorbiditeta odražava složenost KOPB-a i čini osnovu za individualiziranu terapiju.

Međutim, istraživanja pokazuju da KOPB često puta ostaje neprepoznata zbog slabe osviještenosti stanovništva, kako u razvijenim, tako i u nerazvijenim zemljama. KOPB nastupa polako, obično kod starijih od 50 godina. Prvi simptomi mogu biti slabo izraženi, pa osobe često simptome poput zaduhe pripisuju normalnom starenju ili nedovoljnoj kondiciji te smatraju da je pušački kašalj normalan, pa tako 45 - 65 % bolesnika s KOPB-om ostaje nedijagnosticirano. Osim nedovoljne osviještenosti, slabom postavljanju dijagnoze pridonosi i sam dijagnostički test. Spirometrijom se mogu dobiti podaci o jačini opstrukcije dišnih putova, ali ne može se procijeniti veličina oštećenja u plućima. Dodatni problem je kasno postavljanje dijagnoze bolesti, tek kada nastanu ireverzibilne opstrukcijske promjene u bronhima te zato što se bolesnici jave liječniku pulmologu tek tijekom jednog od pogoršanja bolesti uzrokovanog infekcijom dišnih putova. Egzacerbacije su osobit problem jer povećavaju mortalitet, broj hospitalizacija i troškove liječenja KOPB-a te značajno pogoršavaju plućnu funkciju i dovode do pogoršanja kvalitete života. S obzirom na to da se spirometrija nije pokazala dobrom za probir na KOPB u velikim populacijama, znanstvenici se orijentiraju na osmišljavanje drugih načina otkrivanja bolesti i identifikacije osoba s najvećim rizikom, poput pronalaska dijagnostičkih biomarkera u krvi, mokraći i sputumu (Dance, 2012; Willyard, 2012; Pavičić i Jakopović, 2006; Miše, 2006). S obzirom na navedeno, postoji jasna potreba za otkrivanjem jednostavnih, specifičnih biokemijskih testova koji bi pratili nastanak i razvoj KOPB-a, a mogli bi služiti ranom postavljanju dijagnoze KOPB-a, prevenciji simptoma, praćenju težine bolesti i eventualno predviđanju egzacerbacija, koje bi se onda promjenom terapije možda mogle spriječiti ili barem ublažiti.

1.1.2. Klinički oblici bolesti

Na temelju promjena u dišnim putovima razlikujemo dva temeljna oblika KOPB-a: kronični bronhitis i emfizem (slika 1.1.).



Slika 1.1. Promjene dišnih putova u različitim oblicima KOPB-a (kroničnom bronhitisu i emfizemu) u odnosu na zdravu osobu (prema www.thehealthmagic.com).

Kronični bronhitis je definiran dugotrajnim kašljem i stvaranjem ispljuvka. Nastaje kao rezultat odgovora imunosnog sustava na udahnute štetne čestice i plinove iz dima cigareta. Ostali uzroci su vanjsko zagađenje zraka i profesionalna izloženost štetnim tvarima. Kronični bronhitis je karakteriziran upalom epitela centralnih dišnih putova i žlijezda koje stvaraju sluz. Ova upala je povezana s pojačanim stvaranjem sluzi, zadebljanjem stijenki bronha, smanjenim uklanjanjem čestica putem cilijarnih stanica te povećanom propusnošću epitelne barijere dišnih putova. Kronično pojačano izlučivanje sluzi doprinosi težini bolesti u kasnijim stadijima kada povećava rizik nastanka egzacerbacija koje mogu ubrzati smanjenje FEV_1 (MacNee, 2005; Fischer i sur., 2011).

Emfizem se definira kao povećanje distalnih dišnih prostora, iza krajnjih bronhiola, uzrokovano razaranjem stijenki alveola. Javlja se u dva oblika: **centrilobularni**

(centriacilarni), koji nastaje razaranjem alveola smještenih oko bronhiola uključujući proksimalne acinuse, a usko se povezuje s pušenjem cigareta, i **panlobularni (panacinarni)**, koji se povezuje s nedostatkom α_1-antitripsina, a rezultira razaranjem cijelih acinusa (MacNee, 2005; Fischer i sur., 2011). Gubitak integriteta alveola vodi do slabe izmjene plinova u alveolama i zadržavanja zraka zbog smanjene elastičnosti pluća (Morissette i sur., 2009).

Bolesnici s KOPB-om pokazuju različite karakteristične značajke kroničnog bronhitisa, emfizema i / ili astme, ali svi imaju kliničke simptome opstrukcije dišnih putova (Fischer i sur., 2011).

1.1.3. Oštećenja alveolarnih stanica uzrokovana dimom cigareta

Glavne strukturne stanice alveolarnog tkiva pluća su alveolarne stanice tipa I, alveolarne stanice tipa II i endotelne stanice. Najviše su zastupljene alveolarne stanice tipa I odgovorne za održavanje alveolarnih struktura i difuziju plinova do alveolarnih kapilara. Alveolarne stanice tipa II glavni su izvor površinskih proteina i preteča su alveolarnim stanicama tipa I. Endotelne stanice su zajedno s alveolarnim stanicama tipa I zadužene za difuziju plinova između alveola i kapilara (Morissette i sur., 2009).

Smatra se da je razaranje alveolarnih epitelnih i endotelnih stanica putem proteolitičkih enzima osnovni mehanizam povećanja dišnih prostora kod emfizema pluća. Proteaze razgrađuju komponente izvanstaničnog matriksa, a porijeklom mogu biti iz makrofaga i drugih upalnih stanica aktiviranih primjerice dimom cigareta, ali i iz strukturnih stanica, poput epitelnih i endotelnih stanica (Taraseviciene-Stewart i Voelkel, 2008).

Kronična izloženost dimu cigareta izravno oštećuje epitel dišnih putova. To dovodi do otpuštanja unutarstaničnih molekula koje djeluju kao signali za receptore na epitelnim stanicama putem kojih se izaziva otpuštanje citokina koji privlače upalne stanice i započinje upalni odgovor. Također dolazi do otpuštanja proteolitičkih enzima i reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *reactive oxygen species*, ROS) koji uzrokuju dodatna oštećenja ukoliko nisu u ravnoteži s antiproteazama i antioksidansima. Kako bi se održala homeostaza u plućima, potrebno je stalno obnavljanje stanica i izvanstaničnog matriksa. Međutim, dim cigareta ograničava proces popravka alveola, što vodi do nastanka fibroze (Decramer i sur., 2012).

1.2. MEHANIZMI PATOGENEZE KOPB-a

Patološke promjene i klinički simptomi KOPB-a rezultat su međudjelovanja genskih čimbenika oboljele osobe i izloženosti čimbenicima rizika, osobito dimu cigareta. Kao rezultat ovih međudjelovanja nastaju kronična upala, oksidacijski stres, neravnoteža proteaza i antiproteaza te propadanje alveola putem apoptoze (MacNee, 2005; Fischer i sur., 2011).

1.2.1. Upalna reakcija

Karakteristična značajka KOPB-a je pojačan ili neprimjeren upalni odgovor pluća na udahnute čestice i plinove, što može dovesti do oštećenja pluća (MacNee, 2005). Smatra se da je pušenje cigareta glavni uzrok kronične upale u plućima, ali i drugi čimbenici, poput profesionalne izloženosti prašini, vanjskog zagađenja zraka ili virusnih infekcija, dovode do nastanka bolesti (Roth, 2008).

I urođeni i stečeni imunosni odgovor su uključeni u nastanak upale u plućima pušača i oboljelih od KOPB-a. Pušenje cigareta povezano je s infiltracijom makrofaga, neutrofila i $CD8^+$ T-limfocita u centralne dišne putove (pregledno opisano u literaturi: MacNee, 2005; Roth, 2008; Fischer i sur., 2011). Aktivirane imunosne stanice otpuštaju različite proupalne, mitogene i profibrozne čimbenike, što dovodi do promjena u ponašanju stanica dišnih putova, uključujući epitelne stanice, fibroblaste i glatke mišićne stanice. Proupalni čimbenici otpušteni iz aktiviranih imunosnih stanica stimuliraju ostale stanice na stvaranje i otpuštanje dodatnih proupalnih čimbenika, što privlači još više imunosnih stanica na mjesto upale, čime se zatvara krug koji podržava upalni proces.

Dim cigareta aktivira makrofage u dišnim putovima na otpuštanje proupalnih medijatora, kao što su faktor tumorske nekroze (eng. *tumor necrosis factor*, TNF)-α, interleukin (IL)-8 i drugi CXC kemokini, monocitni kemotaktični peptid 1 (eng. *monocyte chemotactic peptide-1*, MCP-1), leukotrien B_4 te ROS. Makrofagi također otpuštaju proteaze, uključujući metaloproteinaze matriksa (eng. *matrix metalloproteinase*, MMP)-2, -9 i -12, katepsine K, L i S te neutrofilnu elastazu. Povećan broj makrofaga u plućima oboljelih od KOPB-a i pušača mogao bi biti rezultat pojačanog privlačenja monocita iz cirkulacije kao odgovor na kemotaktične kemokine, poput MCP-1 i CXC kemokina.

Mehanizam nakupljanja $CD8^+$ T-limfocita u dišnim putovima oboljelih od KOPB-a nije u potpunosti razjašnjen. T-stanice u perifernim dišnim putovima oboljelih od KOPB-a imaju povećanu ekspresiju CXCR3, receptora koji se aktivira proteinom 10 kojeg inducira interferon. Ekspresija proteina 10 kojeg inducira interferon je povećana u bronhijalnim epitelnim stanicama, te bi to moglo pridonositi nakupljanju $CD8^+$ T-limfocita. Sama uloga $CD8^+$ T-limfocita u patogenezi KOPB-a također nije potpuno razjašnjena. $CD8^+$ T-limfociti mogu otpuštati TNF-α, perforine i granzime te aktivirati vanjski put apoptoze posredovan Fas ligandom.

Infiltracija neutrofila bi mogla biti kritična za razaranje pluća jer oni otpuštaju proteaze, kao što su neutrofilna elastaza, katepsin G, proteinaza 3, MMP-8 i MMP-9. Ove proteaze mogu pridonijeti razaranju alveola i potaknuti izlučivanje sluzi. Osim proteaza, aktivirani neutrofili mogu otpuštati i ROS koji također mogu izravno oštetiti pluća. Nakon vezanja za endotelne stanice, neutrofili mogu migrirati dalje u dišne putove pod utjecajem kemotaktičnih čimbenika, poput leukotriena B_4, IL-8, onkogena α povezanog s rastom i neutrofilnog atraktanta 78 porijeklom iz epitelnih stanica.

Kod pušača s KOPB-om koji su prestali pušiti, funkcija pluća se može popraviti ili se može usporiti brzina opadanja funkcije pluća (Scanlon i sur., 2000), ali kronična upala u plućima nastavlja se još dugi niz godina (Willemse i sur., 2005). Pretpostavlja se da je uzrok tome nemogućnost da se otklone sve komponente dima cigareta ili da se popravi oštećeno tkivo. Nakon prestanka pušenja, moguće je da dođe do obnove epitelnih pločastih i vrčastih stanica (eng. *goblet cells*) (Lapperre i sur., 2007), ali se ne može ukloniti povećana masa glatkih mišićnih stanica. Tako preinačene stijenke dišnih putova, osobito zbog povećane mase glatkih mišićnih stanica, dovode do značajnog smanjenja elastičnosti mišića pluća (Wiggs i sur., 1992).

KOPB se smatra bolešću specifičnom za organ (pluća), a karakterizira je kronična upala dišnih putova. Međutim, u posljednje vrijeme prihvaćena je činjenica da mnogi bolesnici pokazuju i znakove sistemske upale. Sistemska upala očituje se povećanim koncentracijama biomarkera, poput citokina (TNF- α i IL-6) i dušikovog oksida, koje se još više povećavaju u egzacerbacijama (Karadag i sur., 2008).

1.2.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres ima središnju ulogu u patogenezi KOPB-a jer, osim što izravno dovodi do oštećenja plućnih struktura, pojačava ostale mehanizme uključene u patogenezu (Cavalcante i de Bruin, 2009).

Oksidacijski stres nastaje kao rezultat neravnoteže između stvaranja oksidansa i djelovanja antioksidansa. Tijekom fizioloških procesa u organizmu dolazi do nastanka reaktivnih kisikovih (superoksidni radikal, $O_2^{-}\cdot$; vodikov peroksid, H_2O_2; hidroksilni radikal, $OH\cdot$) i dušikovih (dušikov oksid, NO) spojeva kao posljedica staničnog disanja, regulacije staničnog rasta, fagocitoze, unutarstanične signalizacije i sinteze različitih tvari, poput hormona i enzima. Ipak, kako bi se neutralizirali mogući negativni učinci ovih procesa, u organizmu postoje i različiti antioksidacijski sustavi: enzimski (superoksidna dismutaza, katalaza, glutationska peroksidaza) i ne-enzimski (reducirani glutation, ubikinon, mokraćna kiselina, transferin, ceruloplazmin, β-karoten, vitamini C i E) (Mak, 2008; Cavalcante i de Bruin, 2009).

Budući da je respiracijski sustav u izravnom doticaju s vanjskim okolišem i izložen visokim koncentracijama kisika, glavna je meta različitih oksidansa endogenog ili egzogenog porijekla. Glavni endogeni izvori reaktivnih spojeva u dišnom sustavu su alveolarni makrofagi, epitelne i endotelne stanice te imunosne stanice (neutrofili, eozinofili, monociti i limfociti). Aktivacijom ovih stanica dolazi do stvaranja $O_2^{-}\cdot$ koji se brzo pretvara u H_2O_2 djelovanjem superoksidne dismutaze. U sljedećoj ne-enzimskoj reakciji u prisustvu željeza iz H_2O_2 nastaje $OH\cdot$ (Fentonova reakcija). Fagociti također imaju važnu ulogu u nastanku ozljede tkiva putem stvaranja reaktivnih spojeva. Od egzogenih oksidansa ističu se zagađivači zraka, poput ozona, dušikovog dioksida te osobito dim cigareta. Međutim, u respiracijskom sustavu nalazimo i neke važne antioksidanse, kao što su mucin, reducirani glutation (GSH), mokraćna kiselina, albumin i askorbinska kiselina (Cavalcante i de Bruin, 2009).

Glavni etiološki čimbenik u KOPB-u je pušenje cigareta. Dim cigareta je smjesa od oko 4700 različitih kemijskih tvari, uključujući različite slobodne radikale, oksidanse i reaktivne kisikove i dušikove spojeve, a samo jedan udah dima sadrži oko 10^{14} slobodnih radikala (Church i Pryor, 1985; Pryor i Stone, 1993). Neravnoteža između oksidansa i antioksidansa u plućima dovodi do oštećenja staničnih lipida, proteina i DNA, što može uzrokovati ozljedu

pluća ili izazvati niz staničnih odgovora putem stvaranja sekundarnih metaboličkih reaktivnih spojeva (Rahman i Adcock, 2006).

Lipidna peroksidacija nastaje oksidacijom višestruko nezasićenih masnih kiselina, čemu su osobito podložni membranski fosfolipidi. To dovodi do promjena u strukturi i propusnosti membrane, gubitka ionskog potencijala stanice, otpuštanja sadržaja iz organela i nastanka krajnjih produkata lipidne peroksidacije, poput 4-hidroksi-2-nonenala (HNE), malondialdehida (MDA) i F_2-izoprostana (Rahman i Adcock, 2006; Cavalcante i de Bruin, 2009). HNE je vrlo reaktivan produkt lipidne peroksidacije s velikim afinitetom prema cisteinskim, histidinskim i lizinskim bočnim ograncima proteina. U alveolarnim epitelnim stanicama, endotelnim stanicama i neutrofilima oboljelih od KOPB-a pronađena je značajno veća razina adukata proteina i HNE u usporedbi s osobama bez opstrukcije dišnih putova (Rahman i sur., 2002). Kod oboljelih od KOPB-a utvđeno je da se koncentracija MDA u serumu povećava s težinom bolesti i obrnuto korelira s FEV_1 (Kluchová i sur., 2007). Povećana razina F_2-izoprostana nađena je u plazmi pušača u usporedbi s nepušačima (Morrow i sur., 1995) te u mokraći oboljelih od KOPB-a u usporedbi s zdravim osobama (Praticò i sur., 1998).

Oksidacijske promjene proteina mogu dovesti do promjene konformacije i gubitka funkcije enzima, strukturnih promjena ili aktivacije transkripcijskih faktora i proteolitičkih sustava (Cavalcante i de Bruin, 2009). Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi iz dima cigareta uzrokuju oksidaciju i nitraciju proteina (Rahman i Adcock, 2006). Nitracijom tirozinskih bočnih ogranaka proteina nastaje 3-nitrotirozin. Povećana razina nitriranih proteina plazme (fibrinogena, transferina, plazminogena i ceruloplazmina) nađena je kod pušača u usporedbi s nepušačima (Petruzzelli i sur., 1997), dok je u ispljuvku oboljelih od KOPB-a nađena veća razina 3-nitrotirozina u neutrofilima i makrofagima u usporedbi s nepušačima (Ichinose i sur., 2000). Proteini koji sadrže cisteinske bočne ogranke (Cys-SH) u obliku tiolata (S^-) podložni su oksidacijskim promjenama. Cisteinski tiolati (Cys-S^-) lako se oksidiraju u sulfensku kiselinu (-SOH) koja je prilično reaktivna i brzo stvara disulfide s obližnjim tiolima ili GSH. Nastali miješani disulfidi mogu se dalje reducirati različitim agensima, poput peroksiredoksina, tioredoksina, sulfiredoksina ili glutaredoksina, u tiolni oblik proteina i GSH. Jaki oksidansi mogu oksidirati Cys-S^- ili Cys-SH u derivate sulfinske (Cys-SO_2H) i / ili sulfonske (Cys-SO_3H) kiseline. Viša oksidacijska stanja u obliku derivata sulfinske i sulfonske kiseline smatraju se ireverzibilnim promjenama i povezuju s oksidacijskim

oštećenjima (Rahman i Adcock, 2006). U plazmi pušača pronađena je značajno veća razina proteina vezanih na glutation u usporedbi s nepušačima (Muscat i sur., 2004).

Oštećenja DNA uzrokovana kisikovim spojevima mogući su uzrok velike učestalosti tumora pluća u oboljelih od KOPB-a (Cavalcante i de Bruin, 2009). U plućima oboljelih od KOPB-a pronađena je veća razina biljega oksidacije gvanina (8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksigvanozina u DNA i 8-okso-7,8-dihidrogvanozina u RNA) u usporedbi s plućima osoba bez KOPB-a (Deslee i sur., 2009). Istraživanje na staničnoj liniji BEAS-2B bronhijalnih epitelnih stanica i normalnim ljudskim bronhijalnim epitelnim stanicama pokazalo je da ekstrakt dima cigareta uzrokuje oštećenja DNA, ukazujući da bi nemogućnost popravka DNA mogla dovesti do gubitka stanica i razaranja plućnog tkiva karakterističnih za emfizem (Liu i sur., 2005).

1.2.3. Neravnoteža proteaza i antiproteaza

Važnu ulogu u patogenezi KOPB-a ima neravnoteža između proteaza i endogenih antiproteaza. Klasični primjer ove neravnoteže javlja se kod teškog oblika nedostatka α_1-antitripsina gdje koncentracija ovog enzima u plućima iznosi 15 - 20 % normalne koncentracije. α_1-antitripsin je glavni inhibitor neutrofilne elastaze koja razgrađuje elastin. Kod teškog oblika nedostatka α_1-antitripsina (PiZZ genotip) dolazi do polimerizacije abnormalnog Z antitripsina u plućima koji onda djeluje kao kemoatraktant za neutrofile što dovodi do privlačenja neutrofila u pluća. Nadalje, dim cigareta kod ovih bolesnika može povećati broj neutrofila u plućima i potaknuti otpuštanje neutrofilne elastaze. Osim toga, dim cigareta može i izravno inaktivirati α_1-antitripsin oksidacijom metioninskih bočnih ogranaka, te na taj način pojačati neravnotežu u korist proteaza (Abboud i Vimalanathan, 2008; Cavalcante i de Bruin, 2009; Fischer i sur., 2011).

U bolesnika s KOPB-om koji nemaju nedostatak α_1-antitripsina također je prisutna neravnoteža između proteaza i antiproteaza koja rezultira razaranjem plućnog parenhima. Ovu neravnotežu izaziva interakcija ROS i proteaza ili antiproteaza. Dim nastao gorenjem cigareta ili biomase koja se koristi za kuhanje i grijanje može inaktivirati endogene antiproteaze ili izazvati akutni upalni odgovor koji aktivira alveolarne makrofage i privlači neutrofile u pluća te ih potiče na otpuštanje različitih proteaza, poput neutrofilne elastaze, proteinaze 3, MMP i katepsina (Abboud i Vimalanathan, 2008; Fischer i sur., 2011). Ove proteaze podržavaju jedna drugu međusobnom aktivacijom ili inaktivacijom endogenih inhibitora, primjerice neutrofilna elastaza inhibira tkivne inhibitore metaloproteinaza matriksa (TIMP), a MMP

razgrađuju α_1-antitripsin. Nadalje, proteaze razgrađuju komponente izvanstaničnog matriksa, poput elastina i kolagena, pri čemu nastaju fragmenti elastina i peptidi porijeklom iz kolagena (poput prolil-glicil-prolina) koji djeluju kemotaktično na monocite (prekursore makrofaga) i neutrofile. Ovi kemotaktični peptidni fragmenti zatvaraju krug koji podržava nakupljanje makrofaga i neutrofila te razaranje pluća (O'Reilly i sur., 2008; Fischer i sur., 2011).

Brojna su istraživanja pokazala povećanu razinu proteaza u biološkim uzorcima oboljelih od KOPB-a i pušača. U bronhoalveolarnom ispirku oboljelih od KOPB-a neurofilna elastaza izravno korelira sa stupnjem emfizema (Fujita i sur., 1990). U tkivu pluća oboljelih od KOPB-a nađena je povećana razina MMP-1, MMP-2, MMP-8 i MMP-9 u usporedbi sa zdravim kontrolama (Segura-Valdez i sur., 2000), dok je u bronhoalveolarnom ispirku pušača s KOPB-om pronađen veći broj makrofaga pozitivnih na MMP-12, nego u bivših pušača s KOPB-om i zdravih ispitanika (Babusyte i sur., 2007). Istraživanja su pokazala povećanu ekspresiju i aktivnost katepsina L te povećanu aktivnost katepsina S u alveolarnim makrofagima pušača u usporedbi s nepušačima (Takahashi i sur., 1993; Reilly i sur., 1991; Shi i sur., 1992). Suprotno ovim podacima, alveolarni makrofagi oboljelih od KOPB-a *in vitro* otpuštaju manje TIMP-1 nego makrofagi pušača i nepušača (Pons i sur., 2005), što podupire teoriju neravnoteže proteaza i antiproteaza u patogenezi KOPB-a.

Genski čimbenici mogu regulirati aktivnost proteaza uključenih u nastanak emfizema (Fischer i sur., 2011). Istraživanje na miševima kojima nedostaje MMP-12 pokazalo je da ih taj nedostatak štiti od nastanka emfizema izazvanog dimom cigareta (Hautamaki i sur., 1997), dok je istraživanje na skupini oboljelih od KOPB-a identificiralo polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) u *MMP12* genu koji štiti funkciju pluća i smanjuje rizik od nastanka KOPB-a kod odraslih pušača (Hunninghake i sur., 2009). Suprotno tome, istraživanja provedena u Japanu i Kini identificirala su SNP u *MMP9* genu koji se povezuje s nastankom emfizema uzrokovanog pušenjem cigareta (Minematsu i sur., 2001; Zhou i sur., 2004; Ito i sur., 2005). Štoviše, SNP u genu za SERPINE2 (izvanstanični inhibitor serinskih proteaza od kojih su neke uključene u aktivaciju MMP, što ga čini neizravnim inhibitorom razgradnje izvanstaničnog matriksa) identificiran je kao gen osjetljivosti povezan s KOPB-om (Demeo i sur., 2006, Zhu i sur., 2007).

1.2.4. Apoptoza

Apoptoza je ključna za održavanje homeostaze tkiva te je u ravnoteži s proliferacijom i diferencijacijom. Apoptoza alveolarnih epitelnih i endotelnih stanica u kombinaciji s gubitkom proliferacije ovih strukturnih stanica u plućima oboljelih od KOPB-a dovodi do razaranja plućnog tkiva (Demedts i sur., 2006).

Apoptoza je programirana smrt stanice koja omogućuje uklanjanje neželjenih, oštećenih ili zaraženih stanica. Različiti signalni putovi su uključeni u ovaj usko regulirani mehanizam stanične smrti. **Vanjski put apoptoze** aktivira se kao odgovor na izvanstanične signale, a posredovan je vezanjem Fas liganda, TNF-α ili liganda sličnog TNF-u koji potiče apoptozu (eng. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) na odgovarajuće receptore stanične smrti (Fas, TNFR ili TRAIL-R1/2) koji se nalaze na površini stanice. To rezultira povezivanjem receptora stanične smrti i stvaranjem signalnog kompleksa koji potiče smrt (eng. *death inducing signaling complex*, DISC). DISC sadrži različite adaptacijske molekule poput proteina koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (eng. *Fas-associated death domain*, FADD). FADD aktivira kaspazu-8/10 koja dalje aktivira kaspazu-3, a kaspaza-3 oslobađa DNazu aktiviranu kaspazama (eng. *caspase-activated DNase*, CAD) od inhibitora CAD-a (eng. *inhibitor of CAD*, ICAD), što ima za posljedicu fragmentaciju DNA. Kaspaza-8/10 također može pokidati pro-apoptozni Bid, koji se dalje u interakciji s Bax i Bak (članovima pro-apoptozne obitelji Bcl-2) premješta do mitohondrija i uzrokuje oslobađanje citokroma c. **Unutarnji put apoptoze** javlja se kao odgovor na fizikalne ili kemijske stresne signale i uključuje otpuštanje citokroma c iz mitohondrija. Citokrom c zajedno s apoptoznim faktorom 1 koji aktivira proteaze (eng. *apoptotic protease activating factor-1*, Apaf-1), (d)ATP-om i kaspazom-9 čini apoptosom, što rezultira aktivacijom kaspaze-9 koja dalje aktivira kaspazu-3 i nastavlja proces apoptoze. Bez obzira koji put je doveo do apoptoze, krajnji rezultat je vrlo sličan. Dolazi do pupanja stanične membrane i stvaranja apoptoznih tjelešaca. Membranski lipid fosfatidil-serin, inače smješten u unutrašnjoj ovojnici stanične membrane, premješta se na vanjsku ovojnicu i služi za prepoznavanje apoptoznih stanica, te omogućuje učinkovito uklanjanje tih stanica. Još jedna od značajki je kondenzacija kromatina i fragmentacija DNA na fragmente veličine 180 - 200 pb. Sve ove promjene dovode do fagocitoze apoptoznih tjelešaca putem imunosnih ili okolnih strukturnih stanica (pregledno opisano u literaturi: Demedts i sur., 2006; Morissette i sur., 2009). S obzirom na to da je apoptoza precizno reguliran proces, uključuje brojne korake koji zahtijevaju energiju u obliku ATP-a, kao što su aktivacija kaspaza, hidroliza makromolekula, kondenzacija kromatina,

pupanje stanične membrane i stvaranje apoptoznih tjelešaca. Ukoliko stanici nedostaje ATP, način stanične smrti se mijenja iz apoptoze u nekrozu (Zamaraeva, 2005).

Za razliku od apoptoze, **nekroza** je manje kontrolirani proces umiranja stanica koji nastaje zbog težeg akutnog oštećenja, u kojem stanica nema aktivnu ulogu i koji je teško spriječiti. Tijekom nekroze stanice bubre i pucaju jer se gubi cjelovitost stanične membrane, te se stanični sadržaj oslobađa u okolinu i uzrokuje upalu i oštećenje susjednih stanica (Demedts i sur., 2006; Guyton i Hall, 2006).

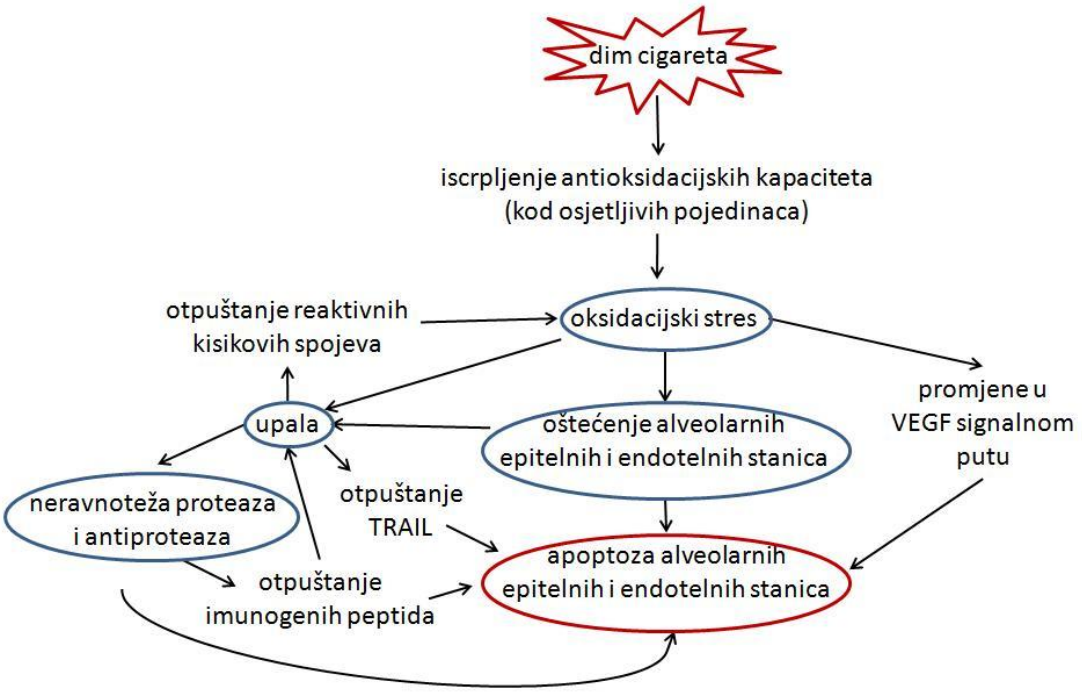
Poremećaj ravnoteže između apoptoze i proliferacije u tkivu pluća pridonosi patogenezi KOPB-a (Demedts i sur., 2006). Različita istraživanja na uzorcima tkiva pluća oboljelih od KOPB-a pokazala su veći broj endotelnih, alveolarnih epitelnih, intersticijskih i proupalnih stanica (neutrofila i limfocita) u fazi apoptoze u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (Segura-Valdez i sur., 2000; Kasahara i sur., 2001; Yokohori i sur., 2004; Imai i sur., 2005; Calabrese i sur., 2005). Neka istraživanja pokazala su veću proliferaciju alveolarnih stanica kod oboljelih od KOPB-a (Yokohori i sur., 2004; Imai i sur., 2005), dok su Calabrese i suradnici (2005) pokazali da nema razlike u proliferaciji alveolarnih stanica između bolesnika s emfizemom i kontrolnih ispitanika, što upućuje na to da bi proces obnove plućnog tkiva mogao biti nadvladan razaranjem ili umanjen djelovanjem nepoznatih mehanizama (Morissette i sur., 2009).

Stanična smrt strukturnih stanica pluća (epitelnih, endotelnih, a moguće i fibroblasta) kao odgovor na dim cigareta može se povezati s manjkom faktora rasta, oštećenjima uzrokovanim oksidacijskim stresom ili unutarstaničnim odgovorom na stres (npr. stresom endoplazmatskog retikuluma, aktivacijom proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima) (Tuder i Petrache, 2012; Morissette i sur., 2009).

U posljednje vrijeme smatra se da ulogu u apoptozi i razvoju emfizema ima vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). VEGF je ključni faktor za održavanje endotela koji djeluje putem svoja dva receptora, VEGFR1 i VEGFR2. VEGFR1 je odgovoran za inhibiciju proliferacije endotelnih stanica, dok VEGFR2 potiče ovaj proces (Morissette i sur., 2009). Snižena razina VEGF i VEGFR2 pronađena je u plućima bolesnika s emfizemom u usporedbi sa zdravim kontrolama (Kasahara i sur., 2001;

Marwick i sur., 2006), što se povezuje s apoptozom endotelnih stanica (Morissette i sur., 2009).

Morissette i suradnici (2009) su predložili model kojim su pokušali objasniti povećanu apoptozu u bolesnika s emfizemom (slika 1.2.). Većina bolesnika s emfizemom su pušači (90 %), a dim cigareta je smjesa brojnih oksidansa. Kod pojedinaca sa slabijom antioksidacijskom obranom (genska podloga) zbog kronične izloženosti dimu cigareta potroše se mehanizmi za obranu od oksidansa i dolazi do nastanka oksidacijskog stresa, što vodi do oštećenja alveolarnih stanica, te posljedično apoptoze alveolarnih stanica. Nadalje, oksidacijski stres aktivira imunosne stanice i započinje upalni proces. Aktivirani neutrofili i makrofagi otpuštaju ROS, zbog čega oksidacijski stres ostaje prisutan i nakon prestanka pušenja. Aktivirani neutrofili i makrofagi otpuštaju i različite proteaze koje dovode do nastanka neravnoteže između proteaza i antiproteaza, što potiče apoptozu alveolarnih epitelnih i endotelnih stanica. Pretjerana aktivnost proteaza i oksidacijski stres odgovorni su i za otpuštanje imunogenih peptida koji mogu potaknuti autoimuni odgovor i apoptozu alveolarnih stanica. Upalne molekule, popout TNF, i oksidacijski stres mogu potaknuti apoptozu alveolarnih stanica putem TRAIL receptora. Osim toga, oksidacijski stres može djelovati na VEGF signalni put i uzrokovati apoptozu alveolarnih endotelnih stanica i posljedično alveolarnih epitelnih stanica.



Slika 1.2. Model mehanizama uključenih u nastanak apoptoze u bolesnika s emfizemom (prema Morissette i sur., 2009).

Prema tome, u patogenezi KOPB-a kronična upala, neravnoteže proteaza i antiproteaza, oksidacijski stres i apoptoza su međusobno povezani procesi koje je još potrebno proučiti kako bi se utvrdio mehanizam kojim dim cigareta dovodi do oštećenja pluća.

1.3. REGULACIJSKI PROTEINI I ENZIMSKI SUSTAVI U PATOGENEZI KOPB-a

1.3.1. Stres endoplazmatskog retikuluma (ER stres)

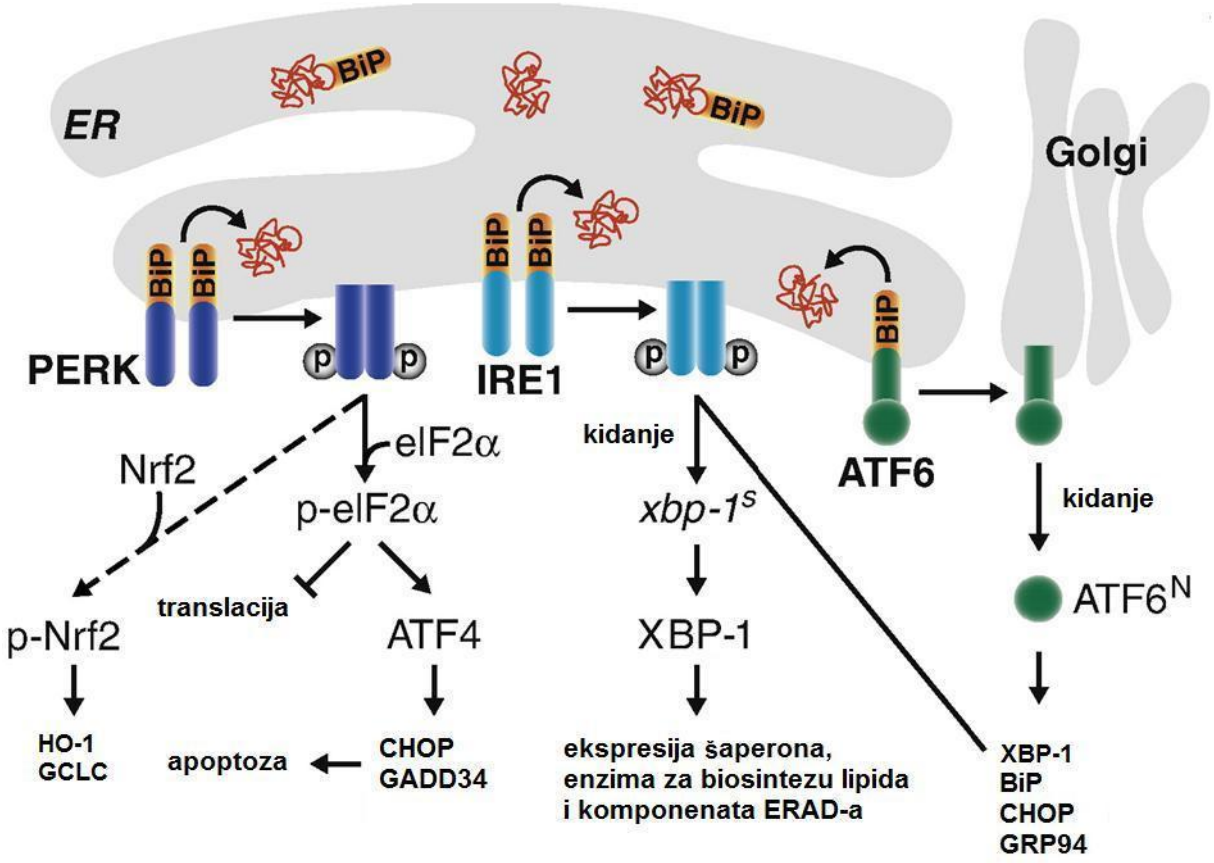
Endoplazmatski retikulum (ER) je stanični organel na kojem se odvija sinteza proteina, pravilno smatanje proteina, post-translacijske modifikacije i kontrola kvalitete. Međutim, u različitim stresnim stanjima, poput oksidacijskog stresa, može doći do nakupljanja krivo smotanih ili razmotanih proteina u ER-u, što nazivamo stresom endoplazmatskog retikuluma (ER stres) (Kelsen i sur., 2008; Todd i sur., 2008).

1.3.1.1. Biokemijske promjene u ER stresu

ER ima mogućnost da ponovno uspostavi homeostazu proteina aktivacijom nekoliko različitih signalnih putova koji se zajednički nazivaju odgovor na razmotane proteine (eng. *unfolded protein response*, UPR) (detaljno opisani u literaturi: Hengstermann i Müller, 2008; Jorgensen i sur., 2008; Shore i sur., 2011; Walter i Ron, 2011). UPR potiče preživljavanje stanice smanjenim nakupljanjem krivo smotanih proteina u ER-u na nekoliko načina: usporavanjem translacije proteina, poticanjem sinteze šaperonskih proteina i povećanjem razgradnje proteina putem ubikvitin-proteasomalnog sustava, procesom koji još nazivamo i razgradnja povezana s ER-om (eng. *ER-associated degradation*, ERAD) (Hoseki i sur., 2010). Ukoliko UPR ne uspije razriješiti ER stres dovodi se u pitanje normalno funkcioniranje stanice, te UPR može potaknuti programiranu staničnu smrt.

UPR signalni putovi djeluju pomoću tri različita transmembranska proteina u ER-u (slika 1.3.):

- kinaze ER-a slične proteinskoj kinazi koja se aktivira dvolančanom RNA (PKR) (eng. *double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase*, **PERK**),
- enzima 1 kojemu je potreban inozitol (eng. *inositol requiring enzyme 1*, **IRE1**),
- aktivirajućeg transkripcijskog faktora 6 (eng. *activating transcription factor 6*, **ATF6**).



Slika 1.3. Shematski prikaz UPR signalnih putova (prema Hengstermann i Müller, 2008).

Pod utjecajem ER stresa, protein koji veže imunoglobuline (eng. *binding immunoglobulin protein*, BiP), poznat i kao protein veličine 78 kDa reguliran glukozom (eng. *glucose-regulated protein 78 kDa*, GRP78), a koji je šaperonski protein smješten u ER-u, oslobađa se iz kompleksa s PERK, IRE1 i ATF6. PERK se oligomerizira te fosforilira samu sebe i eukariotski faktor 2α inicijacije translacije (eng. *eukaryotic translation initiation factor 2α,* eIF2α), čime se neizravno inhibira eIF2 i inhibira translacija mRNA. Na taj način PERK smanjuje *de novo* sintezu proteina u ER-u i ublažava ER stres. Međutim, neke mRNA koje sadrže kratke otvorene okvire čitanja u svojoj 5'-netranslacijskoj regiji se pretežno translatiraju kad ima manje eIF2, poput transkripcijskog faktora ATF4. Ciljni geni ATF4 su gen za protein homologan proteinu koji se veže za CCAAT / pojačivač (eng. *CCAAT / enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein*, CHOP) i gen za protein 34 kojeg induciraju zaustavljanje rasta i oštećenje DNA (eng. *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*, GADD34). CHOP je transkripcijski faktor koji kontrolira ekspresiju gena uključenih u apoptozu, dok je GADD34 protein koji aktivira proteinsku fosfatazu 1C (eng. *protein phosphatase 1C*, PP1C) koja djeluje suprotno od PERK, tj. defosforilira eIF2α. Nadalje, aktivirana PERK izravno aktivira jezgrin faktor 2 sličan eritroidnom faktoru 2 (eng.

nuclear factor erytroid 2-related factor 2, Nrf2), koji snažno inducira transkripciju antioksidacijskih gena, poput hem-oksigenaze 1 (HO-1) i katalitičke podjedinice glutamat-cisteinske ligaze (eng. *glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit*, GCLC).

Aktivirani IRE1, nastao oligomerizacijom u membrani ER-a, kida mRNA koja kodira za protein 1 koji se veže na DNA u području X-sloga (eng. *X-box DNA binding protein 1*, XBP-1), uklanjajući joj intron. Egzoni se povežu i čine "prekrojenu" (eng. *spliced*) mRNA (*xbp-1*^{s}) koja se translatira u aktivne oblike XBP-1. XBP-1 je transkripcijski faktor i ima ulogu u regulaciji ekspresije šaperona, enzima za biosintezu lipida i komponenata ERAD-a.

ATF6 je transkripcijski faktor koji kao transmembranski protein ER-a (90 kDa) nosi veliku luminalnu domenu. Nakupljanjem razmotanih proteina u ER-u, ATF6 se pakira u transportne vezikule i premješta do Golgijevog tijela. Tamo mu dvije proteaze, S1P i S2P, uklanjaju luminalnu domenu i transmembransko sidro. Oslobođeni citosolni N-kraj ATF6^{N} (50 kDa) se premješta u jezgru i aktivira ciljne gene, poput XBP-1, BiP (šaperonski protein iz obitelji HSP70), CHOP i GRP94 (šaperonski protein iz obitelji HSP90).

Ove tri grane UPR-a djeluju usklađeno kako bi se umanjio ER stres. Ukoliko uspiju smanjiti količinu razmotanih proteina, UPR se utišava. Međutim, u slučaju nedovoljne učinkovitosti ovog odgovora na stres, UPR potiče apoptozu (Shore i sur., 2011).

1.3.1.2. ER stres i KOPB

Budući da dim cigareta oštećuje različite stanične makromolekule, vjerojatno je da u plućnim stanicama izaziva ER stres i aktivira zaštitne mehanizame, poput UPR-a (Jorgensen i sur., 2008).

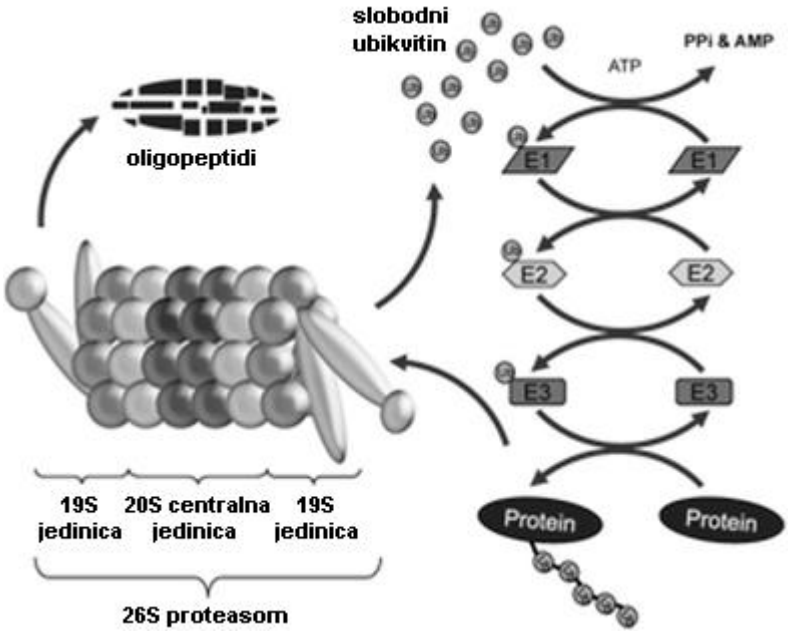
Hengstermann i Müller (2008) su pokazali da dim cigareta inducira ER stresni odgovor u SA 3T3 fibroblastima miša prvenstveno putem aktivacije PERK ogranka UPR-a, što su dokazali povećanom razinom fosforilirane PERK i fosforiliranog eIF2α te inhibicijom sinteze proteina i aktivacijom ATF4. Slične rezultate na normalnim bronhijalnim NHBE i alveolarnim A549 epitelnim stanicama izloženima dimu cigareta prikazali su Jorgensen i suradnici (2008), uz dodatnu aktivaciju ATF6 signalnog puta.

Istraživanje na uzorcima plućnog tkiva pušača, bivših pušača i nepušača (Kelsen i sur., 2008) pokazalo je pojačani UPR odgovor u plućima pušača, dok je isti odgovor kod bivših pušača po jačini bio između pušača i nepušača, ukazujući da je UPR izazvan pušanjem cigareta barem djelomično reverzibilan.

Povećani ER stres zabilježen je i na uzorcima plućnog tkiva bolesnika s teškom KOPB. Pretpostavka je da bi se inhibicija ER stresa, primjerice salubrinalom, mogla koristiti u terapijske svrhe kako bi se ponovno uspostavila homeostaza proteina i umanjila oštećenja pluća izazvana dimom cigareta (Min i sur., 2011).

1.3.2. Ubikvitin-proteasomalni sustav

Ubikvitin-proteasomalni sustav je glavni sustav razgradnje krivo smotanih ili oštećenih proteina u stanici (pregledno opisan u literaturi: Hershko & Ciechanover, 1998; Sherman i Goldberg, 2001; Glickman i Ciechanover, 2002; Ciechanover, 2005; Shang i Taylor, 2011). Na većinu proteina predodređenih za razgradnju putem proteasoma najprije se kovalentno vežu molekule ubikvitina. Ubikvitin je polipeptid građen od 76 aminokiselina, veličine ~8,5 kDa, a služi za obilježavanje proteina koje je potrebno razgraditi putem proteasoma. Ovaj proces zahtijeva najmanje tri enzima: ubikvitin-aktivirajući enzim (E1), ubikvitin-konjugirajuće enzime (E2) i ubikvitin-proteinske ligaze (E3) (slika 1.4.). Najprije ubikvitin-aktivirajući enzim (E1) aktivira glicin na C-kraju ubikvitina stvaranjem visoko energijske tioesterske veze s cisteinskim bočnim ogrankom E1. Ubikvitin-konjugirajući enzimi (E2) prenose aktivirani ubikvitin, također putem tioesterskog međuprodukta, do supstrata specifično vezanih na ubikvitin-proteinske ligaze (E3). Konačno, E3 katalizira stvaranje pseudo-peptidne veze između karboksilne skupine na C-kraju ubikvitina i ε-amino skupine lizinskog bočnog ogranka ciljnog proteina. Na ciljnom proteinu najmanje četiri molekule ubikvitina moraju biti vezane u lancu da bi ga 26S proteasom prepoznao kao supstrat za razgradnju. Dodatne molekule ubikvitina dodaju se na lizinski bočni ogranak (Lys 48) ili N-kraj prethodno konjugirane molekule ubikvitina.



Slika 1.4. Ubikvitin-proteasomalni sustav.

1.3.2.1. Razgradnja proteina putem proteasoma

26S proteasom je velika proteaza s nekoliko katalitičkih mjesta sastavljena od 20S centralne jedinice, koja nosi katalitičku aktivnost, i dvije regulacijske 19S jedinice (slika 1.4.). 20S centralna jedinica ima oblik bačve, a sastavljena je od dva identična vanjska heptamerna α-prstena i dva identična unutarnja heptamerna β-prstena. α podjedinice čine "vrata" za ulazak proteina, dok su katalitička mjesta smještena u središnjem dijelu na β1 (kaspazna aktivnost), β2 (tripsinska aktivnost) i β5 (kimotripsinska aktivnost) podjedinicama. 19S regulacijske jedinice vežu se na jedan ili oba kraja 20S jedinice, a sadrže ATPaze (Rpt1-Rpt6). Interakcija između 19S regulacijske jedinice i 20S centralne jedinice ovisi o hidrolizi ATP-a što omogućava ulazak supstrata u katalitičku jedinicu. Osim toga, hidroliza ATP-a je potrebna i za razmatanje proteina i uklanjanje molekula ubikvitina. 26S proteasom razgrađuje supstrate na male peptide (3 - 23 aminokiseline) uz otpuštanje ubikvitina koji se može ponovno koristiti. Većina peptidnih produkata nastalih putem proteasoma se brzo hidrolizira u aminokiseline putem različitih proteaza i aminopeptidaza (Orlowski i Wilk, 2000; Sherman i Goldberg, 2001; Glickman i Ciechanover, 2002; Friguet, 2006; Poppek i Grune, 2006; Shang i Taylor, 2011). Nastale slobodne aminokiseline se ne mogu pohraniti, već se koriste za sintezu proteina ili za povećane metaboličke potrebe stanica pod utjecajem oksidacijskog stresa (Grune i sur., 1997).

1.3.2.2. Ubikvitin-proteasomalni sustav i KOPB

Uloga ubikvitin-proteasomalnog sustava u KOPB-u slabo je istražena. Pokazano je da se atrofija mišića dijafragme u bolesnika s KOPB-om može povezati s povećanom razinom ubikvitin-proteinskih konjugata (Ottenheijm i sur., 2005) te povećanom aktivnosti proteasoma i ekspresijom ubikvitinske ligaze (Ottenheijm i sur., 2006). Nadalje, Malhotra i suradnici (2009) su na mišjem modelu emfizema pronašli povećanu aktivnost proteasoma kao adaptacijski odgovor na stres izazvan dimom cigareta. Međutim, u istom istraživanju na plućima bolesnika s KOPB-om nađena je smanjena ekspresija podjedinica proteasoma i smanjenje ukupne aktivnosti proteasoma. Unatoč ovim proturječnim rezultatima, možemo pretpostaviti da dim cigareta utječe na aktivnost proteasoma u plućima i tako pridonosi neučinkovitoj razgradnji oštećenih proteina, vidljivih u obliku nakupljenih ubikvitiniranih proteina u uzorcima plućnog tkiva bolesnika s emfizemom (Min i sur., 2011), te razvoju KOPB-a.

1.3.3. Proteini toplinskog šoka (HSP)

Proteini toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSP) ili stresni proteini (pregledno opisani u literaturi: Sharp i sur., 1999; Srivastava, 2008; Barišić, 2008; McConnell i McAlpine, 2013) su evolucijski visoko očuvani proteini koje nalazimo u svim bakterijama, kvascima te stanicama biljaka i sisavaca. Stvaraju se u većim količinama pod utjecajem različitih stresnih stanja, poput topline, kemikalija, teških metala, oksidansa, ishemije i drugih. HSP štite stanicu od krivo smotanih i agregiranih proteina tako što služe kao šaperoni. Oni pomažu novosintetiziranim polipeptidnim lancima da se smotaju u odgovarajući oblik proteina, razmataju proteine koji su oštećeni i pomažu im da povrate svoju strukturu i funkciju, usmjeravaju stanične proteine do konačnog odredišta i čuvaju ih od denaturacije koju mogu uzrokovati različiti stresni poticaji.

1.3.3.1. Biokemijska uloga HSP

Postoji nekoliko obitelji HSP koje su klasificirane prema njihovim približnim molekulskim masama: mali HSP, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 i HSP100 (pregledno opisane u literaturi: Sharp i sur., 1999; Srivastava, 2008; Barišić, 2008; McConnell i McAlpine, 2013).

Mali HSP, relativne molekulske mase između 8,5 kDa za ubikvitin i 20 - 30 kDa za HSP20, HSP25 i HSP27, zajedno s α-kristalinima uključeni su u razgradnju proteina putem proteasoma, služe kao kofaktori za ostale HSP, reguliraju strukturu citoskeleta stanice te

redoks stanje stanice i programiranu smrt stanice. HSP27 je šaperon za proteine citoskeleta i štiti stanice od apoptoze i nekroze. Kada je oligomeriziran, sprečava agregaciju razmotanih proteina nakupljenih u stanici, pri čemu ne troši ATP. Stanični stres inducira ekspresiju HSP27.

HSP32, poznat i kao hem-oksigenaza 1 (HO-1), metabolizira hem do biliverdina, željeza (Fe^{3+}) i ugljičnog monoksida. Gen koji kodira hem-oksigenazu 2 (HO-2) eksprimiran je konstitutivno, dok je HO-1 inducibilan enzim koji se pojačano sintetizira kao odgovor na toplinu i oksidacijski stres. HO-1 i HO-2 reguliraju promet proteina koji sadrže hem, metabolizam željeza i oskidacijski stres. Oni potiskuju oksidacijski stres putem bilirubina (krajnjeg produkta metabolizma hema), a putem ugljičnog monoksida utječu na endotel kapilara (Maestrelli i sur., 2003).

HSP40 dostavlja novosintetizirane ili razmotane polipeptidne lance do HSP70 koji im pomaže da se pravilno smotaju, te ih otpušta uz hidrolizu ATP-a koju stimulira HSP40. HSP47 je pronađen u ER-u, a djeluje kao šaperon za kolagen.

HSP60 je lokaliziran u mitohondriju, a sudjeluje u smatanju monomernih proteina i sklapanju oligomernih kompleksa. Stoga se HSP60 naziva još i "smatajući protein" (eng. *foldase*). Novosintetizirani polipeptidni lanci podložni su različitim silama koje im pomažu da poprime pravilnu konformaciju. Hidrofobne aminokiseline odbijaju vodu i pokušavaju se smjestiti unutar proteinske strukture, dok se hidrofilne aminokiseline nastoje smjestiti na površini. Taj princip nije uvijek dovoljan da proteini poprime odgovarajuću konformaciju, te im u smatanju pomaže HSP60.

Glavni šaperon u citosolu stanice je HSC70 (HSC73), koji je konstitutivni oblik HSP70 eksprimiran u normalnim staničnim uvjetima. HSC70 se veže na proteine tijekom sinteze na ribosomima i pomaže im da se smotaju u odgovarajuću konformaciju. Drugi važan protein iz obitelji HSP70 je inducibilni HSP70 (HSP72), čija aktivacija sinteze je regulirana na transkripcijskoj razini. Općenito u stresnim uvjetima kod kojih dolazi do nakupljanja denaturiranih proteina dolazi do vezanja takvih proteina na HSP proteine, čime se HSP proteini odvajaju od trankripcijskih faktora toplinskog šoka (eng. *heat shock trancription factors*, HSF). To dovodi do fosforilacije HSF i stvaranja trimera koji se premještaju do jezgre, vežu na elemente toplinskog šoka (eng. *heat shock elements*, HSE) koji se nalaze u

promotroskoj regiji *HSP* gena i potiču transkripciju HSP proteina (Kim i Yenari, 2013). U takvim uvjetima sintetizirani HSP72 se veže na denaturirane proteine i pomaže im da povrate tercijarnu strukturu i aktivnost procesom koji zahtijeva hidrolizu ATP-a. Proteini iz obitelji HSP70 imaju dvije važne domene, vezno mjesto za ATP i vezno mjesto za supstrate. Vezno mjesto za ATP ima ATPazni džep na koji se veže HSP40 i regulira njegovu ATPaznu aktivnost, dok vezno mjesto za supstrate sadrži EEVD motiv odgovoran za vezanje proteina i njihovo smatanje. Kako mogu vezati različite proteine, HSP70 služe kao šaperoni u mnogim osnovnim staničnim procesima, kao što su smatanje novosintetiziranih polipeptidnih lanaca u odgovarajuću konformaciju proteina, sklapanje oligomernih proteina i čuvanje proteina od denaturacije koju mogu uzrokovati različiti stresni poticaji. Proteine koji su oštećeni tako da se ne mogu popraviti HSP72 usmjerava na razgradnju putem ubikvitin-proteasomalnog sustava (Samali i Orrenius, 1998). Još neki od članova obitelji HSP70 su GRP78 ili BiP, lokaliziran unutar lumena ER-a gdje služi kao šaperon te mitohondrijski HSP70 (GRP75 ili mito-BiP).

HSP90 je lociran u citosolu, membrani i jezgri stanice. Djeluje kao šaperon koji regulira strukturu i aktivnost proteina uključenih u prijenos signala. HSP90 preuzima smotane proteine od drugih šaperona, te im pomaže da se slože u veće proteinske strukture, poput proteina građenih od više podjedinica. U fiziološkim uvjetima nalazi se u kompleksu s HSF, p53, steroidnim receptorima i još nekim signalnim molekulama, dok se u prisustvu razmotanih proteina odvaja od HSF i pomaže im da povrate strukturu i aktivnost.

HSP100 je konstitutivno eksprimiran u niskoj razini u citoplazmi, jezgri i jezgricama stanice. Pod utjecajem toplinskog šoka, povećava se njegova razina u jezgricama. HSP100 se naziva još i "razmatajući protein" (eng. *unfoldase*). On zajedno s HSP70 razmata oštećene proteine ili neželjene proteinske agregate.

U različitim stresnim uvjetima u kojima dolazi do denaturacije proteina povećava se sinteza HSP kako bi se omogućilo normalno funkcioniranje stanice. Ukoliko šaperoni ne uspiju denaturiranim proteinima povratiti njihovu strukturu i funkciju, proteini se usmjeravaju na razgradnju putem ubikvitin-proteasomalnog sustava (Meiners i Eickelberg, 2012), a ako ova dva sustava zajedno ne uspiju ukloniti oštećene proteine, dolazi do gubitka normalnih staničnih funkcija, što može izazvati smrt stanice (Sherman i Goldberg, 2001).

1.3.3.2. HSP i KOPB

Istraživanja promjena u ekspresiji HSP u bolesnika s KOPB-om i pušača u odnosu na zdrave osobe i nepušače dala su proturječne rezultate. Primjerice, Maestrelli i suradnici (2001) su pronašli povećanu ekspresiju HO-1 i HO-2 u alveolama kroničnih pušača u usporedbi s nepušačima, ali nisu uočili razlike između zdravih pušača i pušača s blagom KOPB. Međutim, na uzorcima pluća bolesnika s teškom KOPB nađena je smanjena ekspresija HO-1 u alveolarnim makrofagima u odnosu na zdrave pušače (Maestrelli i sur., 2003). Smanjena ekspresija HSP70 i HSP27 nađena je u leukocitima bolesnika s KOPB-om (pušača i bivših pušača) u odnosu na nepušače s KOPB-om, ali i u zdravih pušača u odnosu na bivše pušače i nepušače (Rumora i sur., 2008b), dok su Hacker i suradnici (2009) opisali povećanu razinu HSP27, HSP70 i HSP90 u serumu bolesnika s KOPB-om. Moguće je da kronična izloženost dimu cigareta dovodi do iscrpljenja ovog obrambenog mehanizma što bi moglo pridonijeti razvoju KOPB-a.

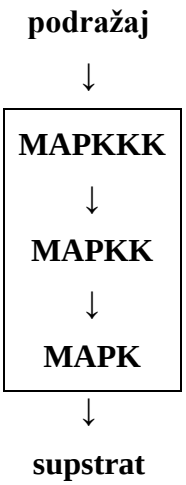
1.3.4. Proteinske kinaze aktivirane mitogenima (MAPK)

Stanice prepoznaju i odgovaraju na izvanstanične podražaje aktiviranjem specifičnih unutarstaničnih putova, poput signalne kaskade koja vodi do aktivacije proteinskih kinaza aktiviranih mitogenima (eng. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK) (pregledno opisane u literaturi: Roux i Blenis, 2004; Adcock i sur., 2006; Mercer i D'Armiento, 2006; Rumora i Žanić Grubišić, 2008). MAPK signalni putovi reguliraju različite stanične aktivnosti, kao što su ekspresija gena, proliferacija, metabolizam, pokretljivost, preživljavanje, apoptoza i diferencijacija. Do sada je kod sisavaca opisano pet različitih skupina MAPK:

- kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK) 1 i 2 (**ERK1/2**),
- kinaze koje fosforiliraju N-kraj c-Jun-a (eng. *c-Jun N-terminal kinases*, **JNK**) **1, 2** i **3**,
- **p38** kinaze (izoforme **α, β, γ** i **δ**),
- **ERK 3** i **4**,
- **ERK5**,

ali su kod kralježnjaka najbolje proučene ERK1/2, JNK i p38 kinaze. Općenito, ERK1/2 se aktiviraju putem faktora rasta i povezuju s preživljavanjem stanice, proliferacijom i diferencijacijom, dok se JNK i p38 kinaze aktiviraju kao odgovor na stresne podražaje, poput osmotskog šoka, ioniziranog zračenja, oksidansa i stimulacije citokinima, te induciraju upalu i apoptozu.

Svaka obitelj ovih kinaza sastoji se od tri kinaze koje djeluju u slijedu jedna za drugom: MAPK, kinaza MAPK (eng. *MAPK kinase*, MAPKK) i kinaza kinaze MAPKK (eng. *MAPK kinase kinase*, MAPKKK) (slika 1.5.). MAPKKK su serin/treoninske kinaze koje se aktiviraju fosforilacijom i / ili interakcijom s malim proteinom koji veže GTP iz obitelji Ras/Rho kao odgovor na izvanstanične podražaje. Aktivacija MAPKKK fosforilira i aktivira MAPKK, koja onda aktivira MAPK dvostrukom fosforilacijom na bočnim ograncima treonina i tirozina (Thr-X-Tyr) smještenih u aktivacijskoj petlji podjedinice VIII kinaze. Aktivirana MAPK fosforilira ciljne supstrate na serinskim i treoninskim ograncima iza kojih slijedi prolin (Ser/Thr-Pro). MAPK fosoforiliraju različite fosfolipaze, transkripcijske faktore, proteine citoskeleta te nekoliko proteinskih kinaza koje se aktiviraju putem MAPK (eng. *MAPK-activated protein kinases*, MK). MK obitelj uključuje ribosomalne S6 kinaze veličine ~90 kDa (eng. *~90-kDa ribosomal S6 kinases*, RSK), mitogenima i stresom aktivirane kinaze (eng. *mitogen- and stress-activated kinases*, MSK) te kinaze koje ulaze u interakciju s MAPK (eng. *MAPK-interacting kinases*, MNK). Općenito, MAPK fosforilacijska kaskada prenosi i amplificira izvanstanične signale kroz citoplazmu do transkripcijskih faktora u jezgri koji potiču ekspresiju ciljnih gena.

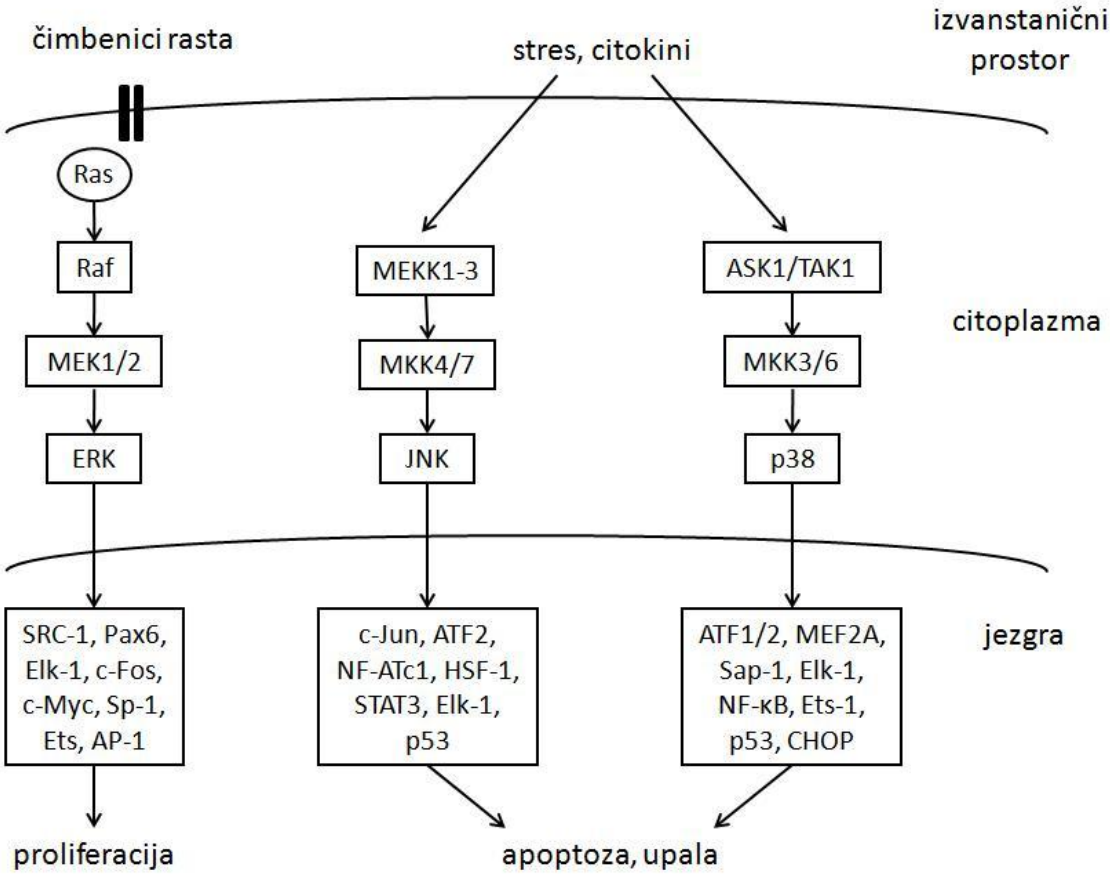


Slika 1.5. Signalna kaskada aktivacije MAPK.

1.3.4.1. ERK signalni put

ERK1 (p44) i ERK2 (p42) su eksprimirane u različitim količinama u svim tkivima, a prema aminokiselinskom sastavu se podudaraju u 83 % slijeda. U stanicama u mirovanju su raspodijeljene unutar cijele stanice, dok se u stimuliranim stanicama ERK1/2 akumuliraju u jezgri. ERK1/2 signalni put je ključni regulator stanične proliferacije. ERK1 i ERK2 se

aktiviraju faktorima rasta, serumom i forbolnim esterima. Receptori na površini stanice, poput tirozin-kinaznih receptora (RTK) i receptora povezanih s G-proteinima, prenose aktivirajuće signale putem Ras (malog proteina koji veže GTP). Aktivni Ras ulazi u interakciju s Raf (MAPKKK) i aktivira ga. Aktivirani Raf veže se na i fosforilira dvojno specifične kinaze MEK1 i MEK2 (MAPKK), koje dalje fosforiliraju ERK1/2 unutar motiva Thr-Glu-Tyr u aktivacijskoj petlji. Amplifikacija unutar signalne kaskade je tolika da je aktivacija oko 5 % Ras molekula dovoljna za potpunu aktivaciju ERK1/2. Aktivirane ERK1/2 fosforiliraju brojne supstrate, uključujući različite membranske proteine (CD120a, Syk i kalneksin), supstrate u jezgri (SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc, STAT-3, Sp-1, Ets, AP-1), proteine citoskeleta (neurofilamente i paksilin) te različite MK proteinske kinaze (slika 1.6.).



Slika 1.6. Pojednostavljena shema aktivacije MAPK signalnih putova.

1.3.4.2. JNK signalni put

Obitelj JNK, poznata i kao proteinske kinaze aktivirane stresom (eng. *stress-activated protein kinases*, SAPK), obuhvaća izoforme JNK1, JNK2 i JNK3 (SAPKγ, SAPKα i SAPKβ) koje su kodirane različitim genima. JNK1 i JNK2 su široko eksprimirane, dok je JNK3 uglavnom

prisutna u živčanom tkivu. Nakon stimulacije JNK se premještaju iz citoplazme u jezgru, ali ne u potpunosti. JNK signalni put uključen je u regulaciju ekspresije proupalnih gena, apoptoze, diferencijacije i proliferacije. JNK se snažno aktiviraju kao odgovor na citokine, UV zračenje, tvari koje oštećuju DNA i manjak faktora rasta. Nekoliko MAPKKK (MEKK1-4, MLK2 i 3, Tpl-2, DLK, TAO1 i 2, TAK1, ASK1 i 2) fosforilira i aktivira MEK4 i MEK7 (MAPKK) koje dalje dvojno fosforiliraju JNK unutar motiva Thr-Pro-Tyr u aktivacijskoj petlji. Supstrati za JNK su različiti faktori transkripcije, poput c-Jun, ATF-2, NF-ATc1, HSF-1, STAT3, Elk-1 i p53 (slika 1.6.).

1.3.4.3. p38 signalni put

p38 obitelj uključuje četiri izoforme (α, β, γ i δ) koje se snažno aktiviraju stresom i upalnim citokinima. U stanicama u mirovanju p38 je prisutna i u jezgri i u citoplazmi stanice, dok je u stimuliranim stanicama pokazano da se p38 prenosi iz citoplazme u jezgru, ali i da ostaje prisutna u citoplazmi. p38 signalni put je uključen u regulaciju upalnog odgovora. Različiti fizikalni i kemijski čimbenici (oksidacijski stres, UV zračenje, hipoksija, ishemija te citokini, poput IL-1 i TNF-α) dovode do aktivacije nekoliko MAPKKK (MEKK1-4, MLK2 i -3, DLK, ASK1, Tpl2 i Tak1) koje dalje aktiviraju MEK3 i MEK6 (MAPKK). MEK3 i MEK6 pokazuju visoki stupanj specifičnosti za p38. Dok MEK6 aktivira sve izoforme p38, MEK3 pretežno fosforilira p38α i p38β. Specifična aktivacija je rezultat stvaranja funkcionalnih kompleksa između MEK3/6 i različitih p38 izoformi te selektivnog prepoznavanja aktivacijskih petlji p38 izoformi. MEK3/6 fosforiliraju p38 unutar motiva Thr-Gly-Tyr u aktivacijskoj petlji. Aktivirana p38 fosforilira različite supstrate, uključujući citosolnu fosfolipazu A2, protein Tau povezan s mikrotubulima, transkripcijske faktore (ATF1 i 2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, NF-κB, Ets-1, p53, CHOP) te nekoliko MK proteinskih kinaza (MSK1 i 2, MNK1 i 2 te MK2 i 3) (slika 1.6.).

1.3.4.4. MAPK i KOPB

Pretpostavlja se da aktivacija MAPK u bolesnika s KOPB-om pridonosi stvaranju i sekreciji sluzi, upalnom odgovoru, ekspresiji citokina, apoptozi, aktivaciji T-stanica, stvaranju MMP i fibrozi. Egzogeni (dim cigareta) ili endogeni (citokini, faktori rasta, oksidansi) signali mogu aktivirati MAPK signalne putove u plućima (Mercer i D'Armiento, 2006).

Jedno istraživanje pokazalo je da u bazalnim uvjetima alveolarni makrofagi pušača imaju veću razinu fosforilirane ERK2 nego nepušači te da nakon stimulacije s bakterijskim

lipopolisaharidom (LPS) kod pušača dolazi do još značajnijeg povećanja razine fosforilirane ERK2. Inhibicijom MEK-1 kod pušača se jače smanjuje otpuštanje IL-8 iz alveolarnih makrofaga, što upućuje na to da pušenje cigareta aktivira MAPK i povećava stvaranje IL-8 u alveolarnim makrofagima (Koch i sur., 2004). Mercer i suradnici (2004) su pokazali da dim cigareta inducira aktivaciju ERK1/2 u SAEC malim epitelnim stanicama dišnih putova i miševima izloženim dimu tijekom 10 dana. Štoviše, povećana aktivnost ERK1/2 pronađena je u epitelnim stanicama dišnih putova bolesnika s emfizemom. Prema isim autorima, indukcija MMP-1 u SAEC stanicama putem dima cigareta zahtijeva aktivaciju ERK1/2.

S obzirom da MAPK mogu regulirati različite stanične funkcije, potrebno je poznavanje međusobnih složenih interakcija ovih signalnih putova kako bi se MAPK inhibitori mogli koristiti kao lijekovi za smanjenje upale, apoptoze, stvaranja citokina i oštećenja tkiva (Mercer i D'Armiento, 2006).

1.3.5. Metaloproteinaze matriksa (MMP)

Metaloproteinaze matriksa (MMP) su obitelj endopeptidaza ovisnih o cinku koje zajedno imaju sposobnost razgradnje različitih komponenti izvanstaničnog matriksa (kolagena, fibronektina, laminina, entaktina, proteoglikana i drugih). Na temelju specifičnosti prema supstratu i homologiji, MMP se mogu svrstati u 6 skupina: kolagenaze, gelatinaze, stromijelizini, matrilizini, membranski vezane MMP i ostale MMP. Ovi enzimi u svom aktivnom mjestu imaju očuvan zajednički motiv HEXXHXXGXXH, koji sadrži tri histidina koji vežu ion cinka, te očuvani metionin (u slijedu XXMXP) koji dolazi iza aktivnog mjesta. Kod gotovo svih MMP na C-kraju nakon katalitičke domene slijedi hemopeksinska domena koja doprinosi vezanju supstrata i tkivnih inhibitora metaloproteinaza matriksa (TIMP), proteolitičkoj aktivnosti i membranskoj aktivaciji. Propeptidna domena na N-kraju MMP enzima sadrži motiv PRCGXPD čiji cisteinski bočni ogranak ulazi u interakciju s cinkom u katalitičkoj domeni i održava enzim inaktivnim sve dok se propeptid ne ukloni proteolizom (Gueders i sur., 2006; Sekhon, 2010; Mocchegiani i sur., 2011).

Endogeni inhibitori MMP enzima su tkivni inhibitori metaloproteinaza matriksa (TIMP)-1, TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4. TIMP su (gliko)proteini relativne molekulske mase od 20 - 30 kDa, a sadrže šest disulfidnih mostova, od kojih prva tri formiraju domenu na N-kraju, a ostala tri domenu na C-kraju. TIMP mogu biti topivi proteini, poput TIMP-1, TIMP-2 i TIMP-4, ili vezani na komponente izvanstaničnog matriksa (TIMP-3). TIMP se svojom

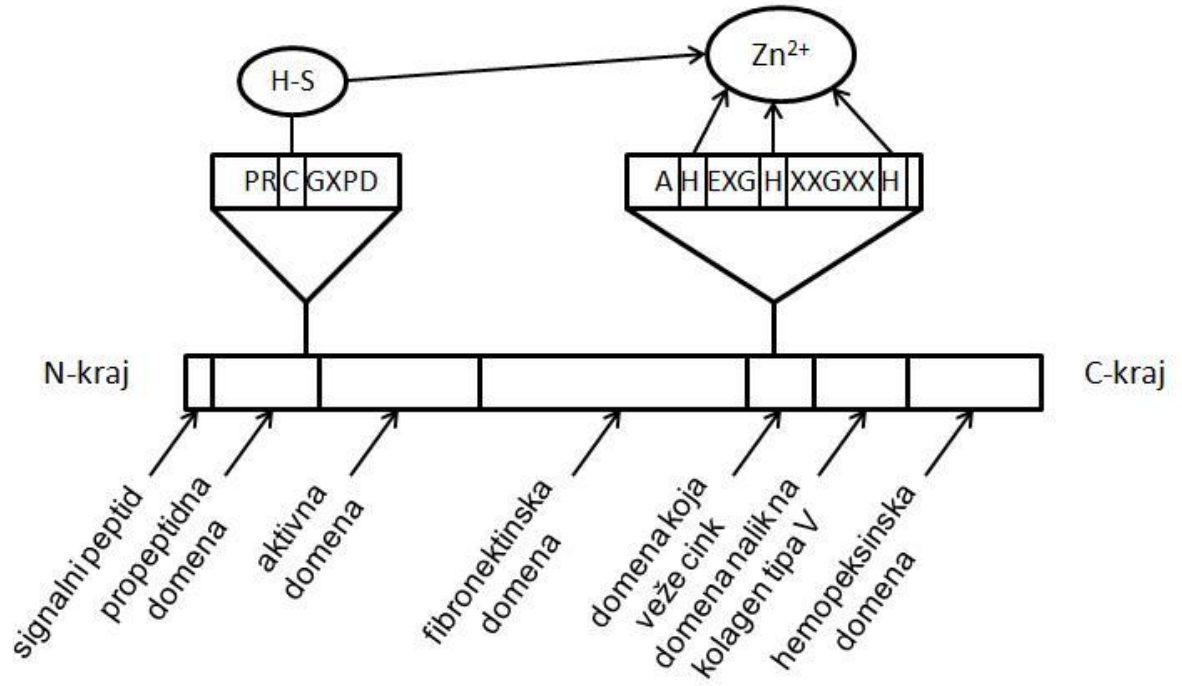
domenom na N-kraju nekovalentno vežu na ion cinka u katalitičkoj domeni aktivnih MMP u omjeru 1:1 i tako sprečavaju vezanje supstrata. Domenom na C-kraju TIMP-1 i TIMP-2 vežu se na hemopeksinske domene proMMP-9 i proMMP-2 (Van den Steen i sur., 2002; Sekhon, 2010; Mocchegiani i sur., 2011).

Glavni inhibitor MMP u plazmi je α_2-makroglobulin, univerzalni inhibitor proteaza. α_2-makroglobulin je građen od četiri gotovo identične domene povezane disulfidnim vezama s cinkom u katalitičkoj domeni. Sintetizira se većinom u jetri. α_2-makroglobulin uklanja višak MMP iz cirkulacije stvarajući α_2-makroglobulin-MMP komplekse. Ti kompleksi se uklanjaju putem specifičnih α_2-makroglobulinskih receptora na površini stanica (Mocchegiani i sur., 2011).

MMP enzimi su uključeni u brojne različite fiziološke procese, poput embriogeneze, remodeliranja tkiva, zacjeljivanja rana i angiogeneze, ali i u patofiziološke procese nastanka i razvoja ateroskleroze, reumatoidnog artritisa, raka, plućnih i drugih bolesti. Različite MMP imaju važnu izravnu ulogu u razgradnji matriksa kod emfizema te neizravno utječu na otpuštanje citokina i angiogenezu što pogoduje nastanku i razvoju KOPB-a (Sekhon, 2010).

1.3.5.1. Metaloproteinaza matriksa-9 (MMP-9)

Metaloproteinaza matriksa-9 (MMP-9, gelatinaza B, EC 3.4.24.25), molekulske mase 92 kDa, pripada skupini gelatinaza unutar obitelji MMP (pregledno je opisana u literaturi: Van den Steen i sur., 2002; Chakraborti i sur., 2003; Sekhon, 2010; Löffek i sur., 2011). Gen za MMP-9 smješten je na kromosomu 20 (q11.2 - q13.1), a sadrži 13 egzona i introna. Poput većine MMP, MMP-9 sadrži propeptidnu domenu, ali unutar katalitičkog mjesta između aktivne domene i domene koja veže cink ima umetnutu fibronektinsku domenu koja se veže za gelatin, laminin, kolagen tipa I i IV. Također sadrži i domenu nalik na kolagen tipa V bogatu sa Ser/Thr/Pro ostacima. Hemopeksinska domena MMP-9 enzima važna je za vezanje TIMP (slika 1.7.).



Slika 1.7. Sematski prikaz strukture MMP-9.

MMP-9 sadrži nekoliko mogućih mjesta za posttranslacijske modifikacije. Tri su moguća mjesta za N-vezane glikane, od kojih je jedno smješteno u prodomeni, a druga dva u aktivnoj domeni. Domena nalik na kolagen tipa V sadrži ponavljanja T/SXXP koja čine mjesta vezanja za brojne O-vezane glikane.

Najpoznatiji fiziološki supstrati za MMP-9 su denaturirani kolageni (gelatini). MMP-9 može kidati brojne proteine izvanstaničnog matriksa (kolagen IV, V, VII, X i XIV, gelatin, entaktin, agrekan, elastin, fibronektin), ali i različite funkcionalne proteine (inhibitor α_1-proteinaza, α_1-antitripsin, α_1-antikimotripsin, supstancija P, proteini koji vežu galaktozid (CBP30 i CBP35), α-receptor IL-2, TGF-β, amiloid-β peptid (1-40)). MMP-9 aktivira IL-1β, odjeljuje angiostatin od plasminogena te razgrađuje proTNF-α i neke CXC-kemokine (Van den Steen i sur., 2002; Gueders i sur., 2006; Sekhon, 2010). MMP-9 odvaja 6 aminokiselina s N-kraja IL-8 (1-77), stvarajući tako aktiviniji IL-8 (7-77), čime se stvara pozitivna povratna sprega jer IL-8 djeluje kemotaktično na neutrofile i potiče ih na otpuštanje MMP-9.

Aktivnost MMP-9 regulirana je na razini transkripcije gena, sekrecije, aktivacije i inhibicije. Transkripcijska regulacija aktivnosti MMP-9 temelji se na prisutnosti različitih funkcionalnih *cis*-elemenata u promotorskoj regiji gena za MMP-9 (TATA slog; mikrosatelitna ponavljanja

CA dinukleotida $(CA)_n$; vezna mjesta za jezgrin stimulirajući protein 1 (eng. *stimulating protein-1*, Sp-1), aktivacijski protein 1 (eng. *activator protein-1*, AP-1), Ets-1 i Ets-2 te jezgrin faktor κB (eng. *nuclear factor-κB*, NF-κB). Nekoliko cis-regulacijskih regija djeluje istodobno u bazalnom i induciranom transkripcijskom odgovoru. Potpuna aktivacija MMP-9 promotora ovisi o usklađenom djelovanju više transkripcijskih faktora, uz neophodno AP-1 vezno mjesto na poziciji -79 pb. Za indukciju MMP-9 gena specifični su signali za NF-κB i Sp-1 vezna mjesta.

Promotorska regija gena za MMP-9 sadrži dva funkcionalno važna polimorfna mjesta uključena u regulaciju ekspresije gena i sklonost prema različitim bolestima: polimorfizam jednog nukleotida (zamjena C baze bazom T) na poziciji -1562 pb i $(CA)_n$ dinukleotidna ponavljanja na -131 pb. -1562 C/T polimorfizam rezultira gubitkom veznog mjesta za transkripcijski represorski protein u ovoj regiji što povećava aktivnost promotora (CC genotip ima nisku, a CT i TT genotipovi visoku transkripcijsku aktivnost) (Zhang i sur., 1999a). Polimorfizam mikrosatelita $(CA)_n$ utječe na transkripcijsku aktivnost promotora gena za MMP-9 tako što je smješten blizu početnog mjesta transkripcije i nekoliko važnih veznih mjesta za transkripcijske faktore (AP-1, Sp-1 i NF-κB). Osim toga, polimorfni slijed može promijeniti konformaciju DNA (iz desne B u lijevu Z strukturu) i tako utjecati na transkripcijsku aktivnost (Shimajiri i sur., 1999). Najveća aktivnost promotora zabilježena je kod alela s 21 (Maeda i sur., 2001) ili 23 uzastopna CA ponavljanja (Peters i sur., 1999), dok se najveća aktivnost MMP-9 povezuje s 21 CA ponavljanjem (Shimajiri i sur., 1999). Većina istraživanja (europskih i američkih) zabilježila je bimodalnu raspodjelu učestalosti alela, s najvećom učestalosti $(CA)_{14}$ alela te alela s $(CA)_{21}$, $(CA)_{22}$ i $(CA)_{23}$ ponavljanja (Nelissen i sur., 2000; Joos i sur., 2002; Tesfaigzi i sur., 2006). Suprotno tome, kod japanske populacije prevladavaju aleli s više ponavljanja (od $(CA)_{20}$ do $(CA)_{22}$) (Shimajiri i sur., 1999).

Osim polimorfizama u promotorskoj regiji, važan bi mogao biti i Q279R polimorfizam u egzonu 6 *MMP9* gena, gdje je u tripletu CAG koji kodira za aminokiselinu Gln nukeotid A zamijenjen nukleotidom G, te dolazi do nastanka tripleta CGG i zamjene aminokiselinom Arg. Kako je taj polimorfizam smješten u katalitičkoj domeni, unutar fibronektinske domene potrebne za vezanje supstrata (Zhang i sur., 1999b), zamjena nenabijene aminokiseline (Gln) pozitivno nabijenom (Arg) mogla bi imati učinak na aktivnost MMP-9 (Tesfaigzi i sur., 2006). Jedno istraživanje provedeno na skupini muškaraca s bolešću koronarnih arterija i zdravim ispitanicima pokazalo je da nema povezanosti između Q279R polimorfizma i ukupne

aktivnosti MMP-9 u plazmi (Nanni i sur., 2007), dok je drugo istraživanje provedeno na ispitanicima s bolešću koronarnih arterija pokazalo da je gelatinolitička aktivnost MMP-9 niža u bolesnika s GG genotipom, nego u bolesnika s AA genotipom (Opstad i sur., 2012).

Ekspresija većine MMP enzima je niska u tkivima, a pojačava se tijekom remodeliranja izvanstaničnog matriksa. MMP-9 je eksprimirana u određenim tipovima stanica, kao što su fibroblasti, keratinociti, endotelne stanice, monociti, tkivni makrofagi i polimorfonuklearni leukociti te različite tumorske stanice. Bazalna ekspresija MMP-9 je niska u većini stanica u usporedbi s neutrofilima, a stimulacijom s većinom faktora rasta i citokina može se pojačati čak i do sto puta. Za usporedbu, MMP-2 (gelatinaza A) je konstitutivno eksprimirana u tkivima, leukocitima (osim u neutrofilima koji je ne stvaraju) i tumorskim stanicama te se može samo djelomično inducirati ili suprimirati (dva do četiri puta), odnosno gen je umjereno osjetljiv na indukciju faktorima rasta i citokinima (tzv. "*housekeeping gene*").

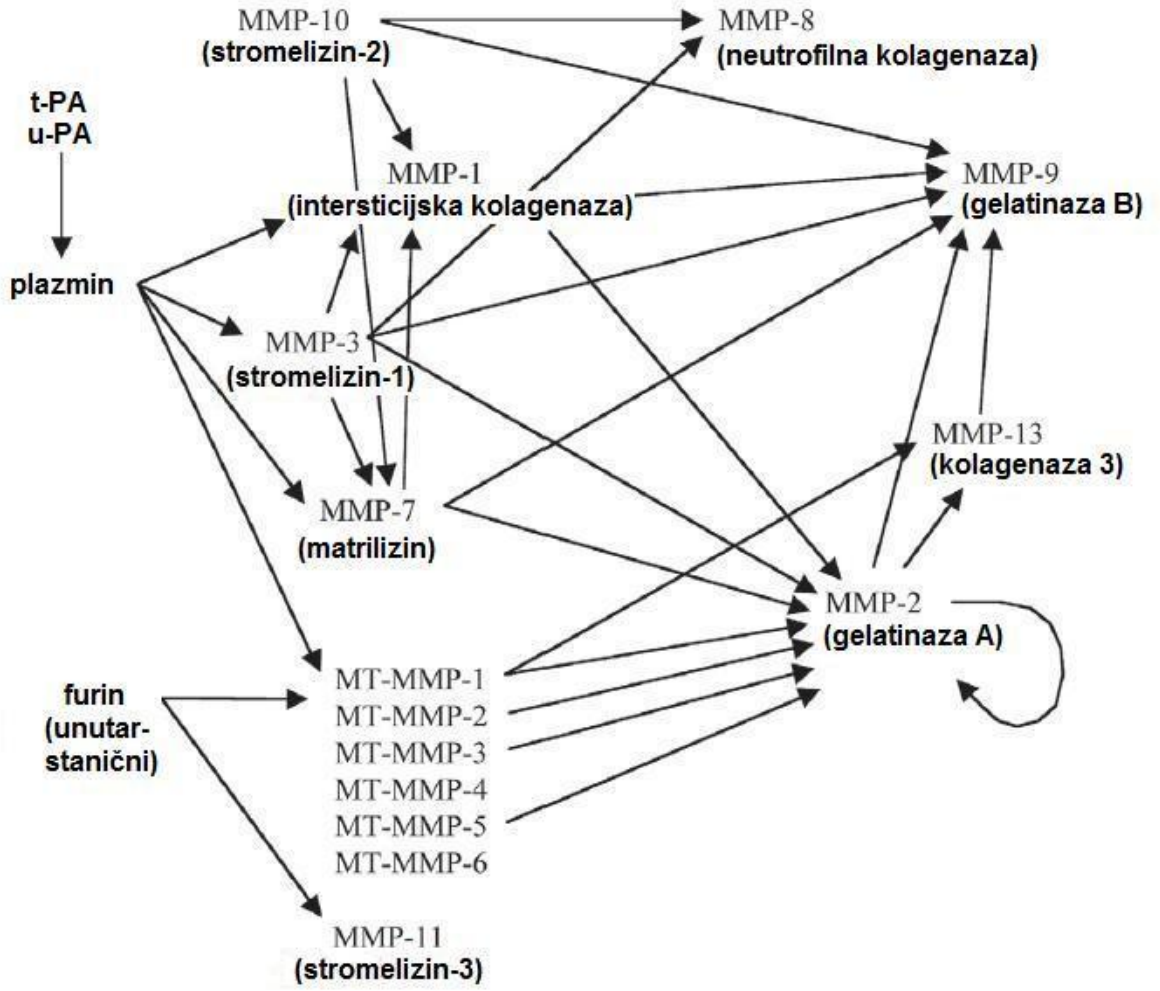
Stimulacija s većinom faktora rasta i citokina započinje njihovim vezanjem na stanični receptor, a glavni mehanizam prijenosa signala do jezgre uključuje aktivaciju MAPK. Aktivirane MAPK fosforiliraju različite transkripcijske faktore. Poznato je da su MAPK signalni putovi uključeni u regulaciju različitih MMP, ovisno o vrsti stimulansa i stanice. Bazalna ekspresija MMP-9 i aktivnost promotora upravljane su putem sve tri signalne MAPK kaskade i ovise o aktivaciji AP-1 motiva na poziciji -79 pb.

MMP-9 se u neutrofilima stvara tijekom sazrijevanja (u nesegmentiranim i segmentiranim neutrofilima) i pohranjuje unutar sekundarnih i tercijarnih granula. Stoga stimulacijom zrelih neutrofila ne dolazi do sinteze MMP-9, već se može izazvati brzo (kraće od 15 minuta) otpuštanje enzima degranulacijom, bez potrebe za transkripcijom i translacijom. Neutrofili sadrže primarne ili azurofilne granule (peroksidaza-pozitivne, sadrže defenzin), sekundarne ili specifične granule (peroksidaza-negativne, laktoferin-pozitivne, sadrže nešto MMP-9), tercijarne granule (laktoferin-negativne, sadrže MMP-9 u većim količinama) i sekretorne vezikule (sadrže alkalnu fosfatazu). Različite granule sintetiziraju se tijekom različitih stadija sazrijevanja neutrofila, a sekrecija ovisi o vrsti stimulansa. Egzocitozom najprije izlaze sekretorne vezikule, zatim tercijarne koje sadrže mnogo MMP-9, onda specifične i na kraju azurofilne granule. Snažni egzogeni stimulansi su forbol-miristat-acetat (PMA), bakterijski tripeptid formilmetionil-leucil-fenilalanin (fMLP) i LPS, dok su endogeni leukotrien B4,

komponente komplementa C3a i C5a te kemotaktični citokini i kemokini. Zanimljivo je da neutrofili ne sintetiziraju MMP-2 niti TIMP-1.

MMP-9 se sintetizira i izlučuje kao zimogen, tj. proenzim, koji ostaje inaktivan sve dok se ne aktivira uklanjanjem propeptida. Propeptid sadrži očuvani slijed PRCGXPD čiji je cisteinski bočni ogranak koordiniran cinkom u katalitičkoj domeni i tako sprečava vezanje i kidanje supstrata. Proteolizom propeptida dolazi do konformacijske promjene i cink postaje dostupan molekuli vode i supstratu, čime se enzim aktivira, a taj mehanizam naziva se "cisteinski obrat".

Različite proteaze, kao npr. tripsin, tkivni kalikrein, katepsin G, kimaza iz mast stanica te neutrofilna elastaza (prisutna u azurofilnim granulama), mogu aktivirati MMP-9. Različite MMP također mogu aktivirati jedna drugu, stvarajući aktivacijsku kaskadu (slika 1.8.). Dva glavna sustava aktivacije MMP su plazminski sustav i MT-MMP. Plazminogen se putem tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA) ili urokinaze (u-PA) prevodi u plazmin, koji aktivira različite MMP, koje dalje aktiviraju jedna drugu i na kraju MMP-9. MT-MMP imaju furinski motiv R-X-R/K-R u svom propeptidu, te se mogu unutar stanice aktivirati furinima (proteinazama koje kidaju pro-oblike proteina i odgovorne su za njihovo usmjeravanje do krajnjeg odredišta u stanici). MT-MMP aktiviraju MMP-2 ili MMP-13, koje dalje aktiviraju MMP-9. MMP-9 se može aktivirati i različitim kemikalijama, poput organskih spojeva sa živom, ureje, detergenata i ROS. Kako se ROS mogu stvarati i u aktiviranim neutrofilima, to bi mogao biti fiziološki put aktivacije MMP-9. Konačno, vezanje proMMP-9 za gelatin ili kolagen tipa IV može aktivirati enzim bez proteolitičkog kidanja propeptida.



Slika 1.8. Aktivacijska mreža MMP-9 (prema Van den Steen i sur., 2002).

Glavni inhibitor MMP-9 je TIMP-1, dok se TIMP-2 i TIMP-3 mnogo slabije vežu na MMP-9. TIMP-2, TIMP-3 i TIMP-4 se većim afinitetom vežu na MMP-2. TIMP-1 je inducibilni protein, dok je TIMP-2 konstitutivno eksprimiran. Interakcija između proMMP-9 i TIMP-1 se odvija većinom putem domena na C-kraju obje molekule. S druge strane, aktivna MMP-9 ulazi u interakciju s TIMP-1 putem domene na N-kraju TIMP-1 koja se nekovalentno veže na aktivno mjesto enzima.

MMP-9 ima fiziološku ulogu u remodeliranju izvanstaničnog matriksa. Uključena je u proces reprodukcije, rast i razvoj te zacjeljivanje rana i angiogenezu. Poremećaj regulacijskih mehanizama može dovesti do smanjenog ili povećanog stvaranja MMP-9, te posljedično do neuravnotežene razgradnje izvanstaničnog matriksa što rezultira patološkim stanjima. Povećana koncentracija MMP-9 nađena je npr. kod nekih bolesti kostiju, reumatoidnog

artritisa, upalnih bolesti živčanog sustava, Alzheimerove bolesti, aterosklerotskih lezija koronarnih žila te različitih tumora gdje je važna za invaziju, metastaziranje i angiogenezu. Važnu ulogu MMP-9 ima u patogenezi različitih plućnih bolesti (astme, KOPB-a, akutnog respiracijskog distres sindroma, bronhiektazija, cistične fibroze).

1.3.5.2. MMP-9 i KOPB

U plućima bolesnika s KOPB-om prisutna je povećana razgradnja izvanstaničnog matriksa i pregradnja dišnih putova, u što je dijelom uključena i neravnoteža između MMP i TIMP. Nekoliko istraživanja je pokazalo povišene razine MMP-9 u alveolarnim makrofagima (Finlay i sur., 1997; Russell i sur., 2002), bronhoalveolarnom ispirku (Betsuyaku i sur., 1999), neutrofilima (Segura-Valdez i sur., 2000), sputumu (Vignola i sur., 1998; Cataldo i sur., 2000; Beeh i sur., 2003; Culpitt i sur., 2005; Boschetto i sur., 2006; Simpson i sur., 2013) i epitelnim stanicama pluća (Li i sur., 2005) oboljelih od KOPB-a. Međutim, ispitivanja koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u serumu / plazmi dala su proturječne rezultate. Većina istraživanja zabilježila je povećanu koncentraciju MMP-9 u bolesnika s KOPB-om u usporedbi s kontrolnim ispitanicima (Mao i sur., 2003; Brajer i sur., 2008; Bolton i sur., 2009; Ilumets i sur., 2011; Piesiak i sur., 2011; Navratilova i sur., 2012). Međutim, u nekim od istraživanja nisu nađene značajne razlike u koncentraciji MMP-9 (Higashimoto i sur., 2005; Shaker i sur., 2008), dok je jedno novije istraživanje opisalo sniženu koncentraciju MMP-9 (D'Armiento i sur., 2013). U dijelu tih istraživanja zabilježena je povećana koncentracija TIMP-1 (Higashimoto i sur., 2005; Ilumets i sur., 2011; Navratilova i sur., 2012), dok su neki istraživači opisali sniženi TIMP-1 (Shaker i sur., 2008; D'Armiento i sur., 2013) ili nisu nađene razlike u koncentraciji TIMP-1 (Piesiak i sur., 2011; Yildirim i sur., 2013) između bolesnika s KOPB-om i kontrolnih ispitanika. Stoga su potrebna daljna istraživanja ukoliko bismo htjeli definirati MMP-9 pokazateljem razaranja plućnog tkiva, osobito zato što je poznato da fragmenti nastali razgradnjom proteina izvanstaničnog matriksa djeluju kemotaktično na leukocite, te dovode do daljnjeg upalnog procesa (Djekic i sur., 2009).

1.3.6. Dipeptidil peptidaza IV (DPPIV)

Dipeptidil peptidaza IV (DPPIV, površinski biljeg stanica CD26, EC 3.4.14.5) je glikoprotein veličine 110 kDa, sastavljen od 766 aminokiselina, a pripada obitelji prolil oligopeptidaza. Transmembranski je protein s većim dijelom C-kraja u izvanstaničnom prostoru, dok se kratki N-kraj nalazi u citoplazmi. Izvanstanični dio sadrži glikozilirano područje, područje bogato cisteinom i katalitičku domenu. Topivi oblik enzima (eng. *soluble DPPIV*, sDPPIV), kojemu

nedostaju transmembranska i citoplazmatska domena, prisutan je u tjelesnim tekućinama, uključujući serum / plazmu. DPPIV je serinska proteaza koja selektivno uklanja dipeptide (X-Pro i X-Ala) s N-kraja različitih peptidnih supstrata koji sadrže prolin ili alanin na predzadnjoj poziciji. DPPIV je eksprimirana na staničnoj membrani brojnih vrsta stanica, uključujući limfocite, endotelne i epitelne stanice različitih organa (pluća, srce, mišići, slezena, gušterača, bubrezi, crijeva, jetra). Ima ulogu u različitim funkcijama u organizmu, npr. u imunosnom sustavu, upali, regulaciji homeostaze glukoze, razvoju tumora, neuroendokrinom sustavu. Kada je prisutna na površini T-limfocita, DPPIV je biljeg njihove aktivacije. Uloga DPPIV je kombinacija njene egzopeptidazne aktivnosti i njenih neenzimskih interakcija s različitim molekulama. Ovaj enzim sudjeluje u kidanju biološki aktivnih molekula, poput različitih peptidnih hormona, neuropeptida, kemokina, peptida porijeklom iz kolagena i drugih prikladnih supstrata. Kidanjem bioloških molekula DPPIV pridonosi njihovoj funkcionalnoj inaktivaciji ili aktivaciji (Lambeir i sur., 2003; Wolf i sur., 2008; Jost i sur., 2009).

1.3.6.1. DPPIV i kronična upala

Promijenjene koncentracije i aktivnosti DPPIV (povećene ili snižene) pronađene su u različitim bolestima, poput tumora, hematoloških bolesti, (auto)imunih i upalnih bolesti te zaraznih bolesti kao što su AIDS i hepatitis C (Lambeir i sur., 2003). Smanjena koncentracija ili aktivnost DPPIV zabilježena je u raznim kroničnim upalnim bolestima, npr. kod kroničnog rinosinusitisa (Grouzmann i sur., 2002), kronične eozinofilne pneumonije (Matsuno i sur., 2007), reumatoidnog artritisa (Cuchacovich i sur., 2001), upalnih bolesti crijeva (Varljen i sur., 2005), celijakije (Detel i sur., 2007) i drugih. Štoviše, serumske koncentracije i aktivnosti ovog enzima obrnuto su povezane s težinom kroničnih bolesti (Matsuno i sur., 2007; Varljen i sur., 2005; Detel i sur., 2007). Međutim, podaci o aktivnosti DPPIV u KOPB bolesnika vrlo su rijetki. Pronađen je inverzni odnos između aktivnosti DPPIV i razine lokalne upale u bioptatu bronhijalnog tkiva bolesnika s kroničnom upalom bronha (od ukupno 21 analiziranog bioptata 5 bolesnika je imalo KOPB, dok su ostali imali astmu ili karcinom pluća) (Landis i sur., 2008). Ako uzmemo u obzir fiziološku ulogu DPPIV u kidanju različitih biološki aktivnih molekula, uključujući kemokine te činjenicu da su u dišnim putovima oboljelih od KOPB-a povećane koncentracije IL-8 i drugih kemokina (MacNee, 2005), možemo pretpostaviti da bi smanjena aktivnost DPPIV mogla pridonositi razvoju upale u plućima.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) jedan je od vodećih zdravstvenih problema u svijetu te jedina kronična bolest koja kontinuirano pokazuje rast mortaliteta. U posljednja dva desetljeća postignut je važan napredak u razumijevanju epidemiologije, patofiziologije, dijagnoze i liječenja KOPB-a, ali važna pitanja ostala su još uvijek otvorena. Osobito su važni uzroci i mehanizmi koji dovode do nastanka bolesti i progresije u kronični oblik.

Glavna pretpostavka ovog istraživanja je da dim cigareta, koji se smatra jednim od glavnih čimbenika razvoja KOPB-a, oksidacijski oštećuje epitel pluća, aktivira upalne stanice i dovodi do neravnoteže aktivnosti proteaza i antiproteaza, te posljedično razgradnje izvanstaničnog matriksa u plućima. Nadalje, pretpostavljamo da lokalne promjene do kojih dolazi u plućima bolesnika dovode do sistemskih promjena, što bi omogućilo otkrivanje biokemijskih pokazatelja pojavnosti i razvoja bolesti u lako dostupnim biološkim uzorcima, poput uzoraka krvi bolesnika.

Stoga smo istraživanje podijelili na *in vitro* ispitivanja učinka dima cigareta na A549 alveolarne epitelne stanice te ispitivanja u uzorcima krvi bolesnika s KOPB-om koje smo uspoređivali sa zdravim ispitanicima.

Specifični ciljevi *in vitro* istraživanja učinka dima cigareta na A549 alveolarne epitelne stanice uključuju ispitivanje:

- citotoksičnosti ekstrakta dima cigareta,
- oksidacijskih oštećenja staničnih komponenti (lipida i proteina),
- aktivacije ER stresnog odgovora i funkcije proteasoma,
- ekspresije HSP70, HSP32 i HSP27,
- aktivacije MAPK signalnih putova,
- otpuštanja proteinaza (MMP-2 i MMP-9) i njihovog inhibitora (TIMP-1),

dok specifični ciljevi istraživanja u uzorcima krvi bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika uključuju ispitivanje:

- utjecaja ekstrakta dima cigareta na otpuštanje MMP-9 i TIMP-1 iz polimorfonuklearnih leukocita,
- dijagnostičke vrijednosti određivanja koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u plazmi kao pokazatelja razvoja bolesti,

- polimorfizama *MMP9* gena,
- dijagnostičke vrijednosti određivanja aktivnosti DPPIV u serumu kao pokazatelja razvoja upale.

Svrha istraživanja je definirati pouzdane biljege koji se mogu mjeriti u uzorcima bolesnika s KOPB-om dobivenim neinvazivnim metodama. Bolje poznavanje mehanizama uključenih u složenu etiopatogenezu KOPB-a moglo bi pridonijeti ranijoj dijagnozi i prognozi bolesti, razumijevanju povezanosti bolesti i komorbiditeta te razvoju lijekova koji bi mogli utjecati na tijek bolesti prije nego dođe do nastanka trajnih strukturnih promjena.

3. EKSPRERIMENTALNI DIO

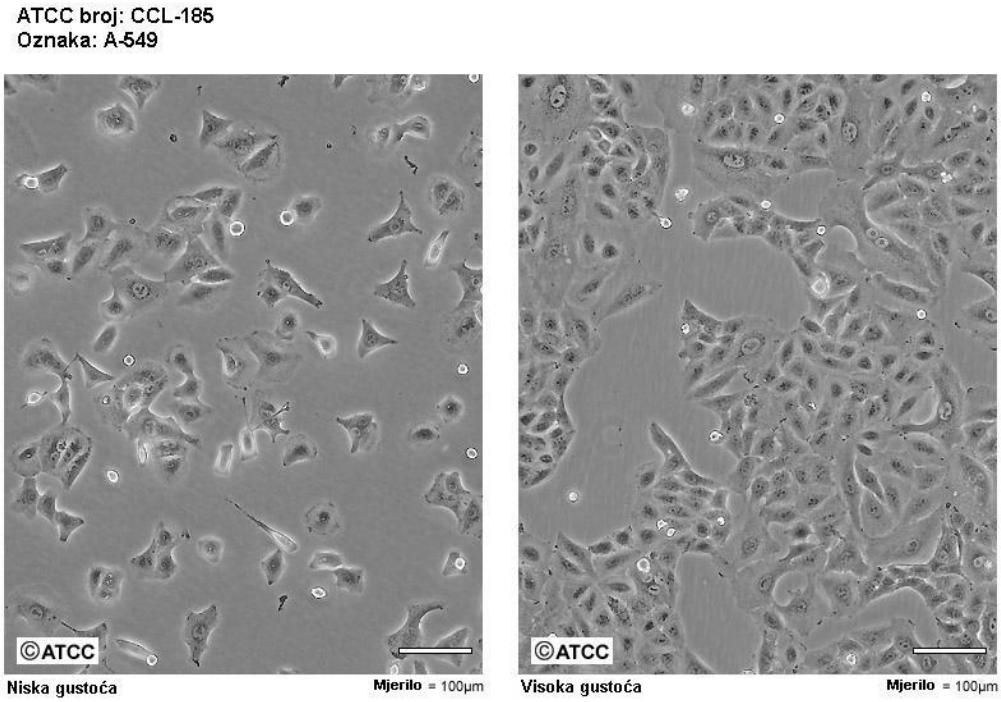
Istraživanje molekularnih mehanizama patogeneze KOPB-a podijelili smo u dvije cjeline:

a) *in vitro* ispitivanja na staničnoj liniji ljudskih alveolarnih epitelnih stanica A549 koje su bile izložene utjecaju dima cigareta te
b) ispitivanja u uzorcima krvi bolesnika s KOPB-om, koji su razvrstani u skupine prema GOLD standardu, u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

3.1. *IN VITRO* ISPITIVANJA

3.1.1. Stanična linija ljudskih alveolarnih epitelnih stanica A549

Stanična linija ljudskih alveolarnih epitelnih stanica A549 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) uspostavljena je 1972. godine iz karcinoma pluća 58-godišnjeg bijelca. Stanice rastu adherirane na podlogu (slika 3.1.). Kada se A549 stanice izlože utjecaju dima cigareta, u njima se razvijaju promjene koje su slične promjenama u stanicama pluća bolesnika s KOPB-om. Ove stanice se uobičajeno koriste kao model za proučavanje utjecaja dima cigareta na pluća jer pokazuju karakteristike tipične za normalne alveolarne epitelne stanice tipa II (Lieber i sur., 1976).



Slika 3.1. Kultura ljudskih alveolarnih epitelnih stanica linije A549 (prema www.lgcstandards-atcc.org).

Stanice su uzgajane u bočicama za uzgoj staničnih kultura (25 cm^2 ili 75 cm^2) s odgovarajućim volumenom kompletnog RPMI medija (5 ili 20 mL) u inkubatoru na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Kompletni RPMI medij sadržavao je RPMI 1640 medij s L-glutaminom (Gibco ili AppliChem), kojemu su dodani 24 mM $NaHCO_3$ (Kemika), 14 mM glukoza (Kemika), 10 mM HEPES (Sigma-Aldrich), 1 mM natrijev piruvat (Fluka), 10 % telećeg fetalnog seruma (inaktiviran toplinom) (Gibco ili Lonza) i 1 % 100x koncentrirane otopine antibiotika i antimikotika (10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina, 25 μg/mL amfotericina B) (Gibco ili Sigma-Aldrich). Stanice su kultivirane do 80 - 90 % konfluentnosti, što je kontrolirano invertnim mikroskopom. Nakon što bi dosegle toliku konfluentnost, stanice su presađene ili tretirane s dimom cigareta. Prije svakog eksperimenta u kojem su izlagane dimu cigareta, A549 stanice su inkubirane preko noći (16 h) u RPMI mediju bez seruma.

3.1.1.1. Presađivanje stanica

Kompletni RPMI medij iznad adherentnih stanica ukloni se vakuum sisaljkom. Stanice se jednokratno isperu otopinom soli puferiranom fosfatom (eng. *phosphate buffer saline* (PBS); 137 mM NaCl (Merck), 2,7 mM KCl (Kemika), 4,3 mM Na_2HPO_4 x 7 H_2O (Kemika), 1,4 mM KH_2PO_4 (Kemika)) da se uklone ostaci seruma koji sadrži α_1-antitripsin koji bi mogao inhibirati djelovanje tripsina u kasnijem koraku. PBS se ukloni vakuum sisaljkom i doda se 0,05 % tripsin-EDTA 1x (Gibco) kako bi se stanice odvojile od podloge. Nakon 5 minuta inkubacije na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2, na stanice se doda kompletni RPMI medij da se zaustavi djelovanje tripsina i stanice se resuspendiraju pipetom. Stanična suspenzija se prenese u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira 5 minuta na 400 g na sobnoj temperaturi. Nadsloj se ukloni vakuum sisaljkom, a talog stanica se resuspendira u 1 mL kompletnog RPMI medija. Najprije se odredi broj stanica u suspenziji, a onda se određeni volumen suspenzije stanica nasadi u novu bočicu za uzgoj staničnih kultura u koju je prethodno stavljen određeni volumen kompletnog RPMI medija. Bočica se spremi u inkubator na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

3.1.1.2. Određivanje broja stanica

Tijekom presađivanja određuje se vijabilnost i broj stanica tako da se pomiješa 40 μL 0,4 % boje tripansko plavilo (Sigma-Aldrich) i 10 μL suspenzije stanica. Smjesa se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Tripansko plavilo je boja koju akumuliraju mrtve stanice, dok žive stanice aktivno izbacuju boju putem membranskih pumpi, pa ostaju neobojene.

Neobojane stanice se zatim broje pod invertnim mikroskopom (pod povećanjem od 400 x) pomoću hemocitometra (Neubauerove komorice).

3.1.2. Izravno izlaganje stanica dimu cigareta

Stanice uzgajane u bočicama za uzgoj staničnih kultura (25 cm^2) bile su izložene izravnom utjecaju dima cigareta prema metodi koju su opisali van der Toorn i suradnici (2007b). Neposredno prije izlaganja dimu cigareta, medij iznad stanica se ukloni i bočica se okrene naopako čime se omogućuje izravan kontakt dima cigareta s alveolarnim epitelnim stanicama. Korištene su cigarete marke 3R4F Kentucky Research Cigarettes (University of Kentucky) kojima su odstranjeni filteri. Cigarete su gorile točno 1 ili 5 minuta brzinom od 8 L/h uz upotrebu peristaltičke pumpe (Watson Marlow). Dim cigareta je izravno upuhivan u bočicu za uzgoj staničnih kultura. Kao negativna kontrola služile su stanice kojima je na isti način u bočicu upuhivan zrak. Nakon izlaganja stanica dimu cigareta ili zraku, medij u kojem su prethodno uzgajane stanice je vraćen u bočicu i stanična kultura je vraćena nazad u inkubator na određeno vrijeme (0,5 h, 4 h ili 24 h), tj. sve do trenutka kada su rađene analize.

3.1.3. Izlaganje stanica ekstraktu dima cigareta

Ekstrakt dima cigareta (eng. *Cigarette Smoke Extract*, CSE) pripreman je neposredno prije svakog pokusa. Korištene su po dvije cigarete marke 3R4F Kentucky Research Cigarettes (University of Kentucky) kojima su odstranjeni filteri. Dim cigareta je propuhan kroz 25 mL RPMI medija bez seruma upotrebom vakuum sisaljke. Svaka cigareta gorjela je oko 5 minuta. Tako pripremljeni ekstrakt dima cigareta označen je kao 100 % koncentrirani, a za pokuse je razrijeđen s RPMI medijem bez seruma na željene koncentracije unutar 30 minuta od pripreme (van der Toorn i sur., 2007a).

Standardizacija ekstrakta dima cigareta izvršena je tako da je 100 %-tni ekstrakt razrijeđen na koncentracije od 20 %, 10 %, 5 %, 2,5 % i 1,25 %. Potom je, koristeći spektrofotometar (CECIL Aquarius CE 7200), svim ekstraktima izmjerena apsorbancija na 320 nm prema RPMI mediju bez seruma kao slijepoj probi. Pokus je ponovljen šest puta u tri uzastopna dana. Tijekom pripreme ekstrakta dima cigareta za svaki pojedini pokus, provjereno je odgovara li njegova apsorbancija na 320 nm dobivenim standardnim vrijednostima. Zatim je taj ekstrakt korišten za tretiranje stanične linije ljudskih alveolarnih epitelnih stanica A549.

Prije izlaganja stanica ekstraktu dima cigareta, stanice koje su rasle u bočicama za uzgoj staničnih kultura presađene su na pločice sa 6 jažica. U svaku jažicu nasađeno je toliko stanica da ih na dan prije pokusa bude 1 x 10^6 u 2 mL medija. Dan prije pokusa sa stanica je uklonjen kompletni RPMI medij i stanicama je dodan RPMI medij bez seruma. Zatim su stanice u triplikatu tretirane svježe pripremljenim ekstraktom dima cigareta u koncentracijama od 0 % (nestimulirane stanice, ns), 1,25 %, 2,5 %, 5 %, 10 % ili 20 % te inkubirane tijekom određenog vremena (4 h, 6 h, 8 h, 24 h ili 48 h). Nakon završene inkubacije medij iznad stanica se centrifugira na 1000 g tijekom 5 minuta na +4˚C, a dobiveni nadsloj alikvotira i pospremi na -20˚C za daljnje analize, dok se adherirane stanice liziraju na način koji ovisi o metodi analize koja se primjenjuje u sljedećem koraku.

3.1.4. Priprema lizata stanica

Ovisno o kasnije korištenoj metodi, stanice su lizirane sonikacijom (točka **3.1.4.1.**) ili puferom za liziranje stanica (točka **3.1.4.2.**).

3.1.4.1. Priprema lizata stanica sonikacijom

Nakon završenog tretiranja stanica nasađenih na pločice sa šest jažica, pločice se stave na led, medij iznad stanica se ukloni, a adherirane stanice se isperu dva puta ledeno hladnim PBS-om. U svaku jažicu doda se po 400 µL 0,05 % tripsin-EDTA 1x (Gibco) i ostavi 5 min u inkubatoru na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Djelovanje tripsina zaustavi se dodatkom 1600 µL kompletnog RPMI medija u svaku jažicu. Stanice iz svake jažice se resuspendiraju pipetom, prenesu u epruvetice od 2 mL i centrifugiraju 5 minuta na 400 g na +4˚C. Nadsloj se ukloni vakuum sisaljkom, a talog stanica se resuspendira u 1 mL ledeno hladnog PBS-a. Zatim se stanice liziraju na 4 W tijekom 15 s upotrebom ultrazvučnog homogenizatora serije 4710 (Cole-Parmer Instrument Co.). Tako lizirane stanice se centrifugiraju na 14000 rpm (EBA 12 R, Hettich Zentrifugen) tijekom 20 minuta na +4˚C. Jedan dio dobivenog nadsloja se pospremi na -20˚C za određivanje koncentracije proteina, dok se ostatak nadsloja alikvotira i pospremi na -20˚C za daljnje analize (određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina i MDA). Za određivanje koncentracije MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 stanice su lizirane na isti način uz dodatak proteaznih inhibitora (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) otopini PBS-a u kojoj su stanice resuspendirane prije sonikacije.

3.1.4.2. Priprema lizata stanica za elektroforezu u SDS-poliakrilamidnom gelu i Western blot analize

Nakon završene obrade stanica nasađenih na pločice sa šest jažica, pločice se stave na led, medij iznad stanica se ukloni, a adherirane stanice se isperu dva puta ledeno hladnim PBS-om. U svaku jažicu doda se po 200 μL ledeno hladnog pufera za liziranje stanica (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 % glicerol, 1 mM natrijev ortovanadat uz dodatak proteaznih inhibitora (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)) i ostavi 20 minuta da stoji na ledu. Zatim se stanice odvoje od podloge blagim struganjem silikonskim strugačem, a sadržaj svake jažice se prenese u epruveticu od 1,5 mL i centrifugira na 14000 rpm (EBA 12 R, Hettich Zentrifugen) tijekom 20 minuta na +4˚C. Jedan dio dobivenog nadsloja se pospremi na -20˚C za određivanje koncentracije proteina, dok se u drugi dio nadsloja doda 6x koncentrirani Laemmlijev pufer za nanošenje uzoraka (0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 12 % SDS, 30 % glicerol, 0,2 % bromfenol plavilo, 12 % β-merkaptoetanol u destiliranoj vodi). Uzorci se prokuhaju tijekom 3 minute na 97˚C, odmah potom ohlade na ledu i pospreme na -20˚C. Ovakvi uzorci su spremni za nanošenje na SDS-poliakrilamidni gel i Western blot analizu.

3.1.5. Određivanje koncentracije proteina u lizatima stanica

Koncentracija proteina u lizatima stanica određena je pomoću komercijalno dostupnog kompleta reagensa Quant-iT Protein Assay Kit (Invitrogen). Komplet reagensa sadrži fluorescentni reagens, pufer za razrjeđivanje i tri standarda BSA (eng. *bovine serum albumin*). Reagens se razrijedi puferom, dodaju se standardi ili uzorci te se sve inkubira tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Zatim se pomoću Qubit fluorimetra (Invitrogen) najprije očita fluorescencija standarda i baždari aparat, a onda se očitaju rezultati za sve uzorke. Dobiveni rezultati (μg/mL) se pomnože s razrjeđenjem (omjer volumena razrijeđenog reagensa i uzorka).

3.1.6. Određivanje vijabilnosti stanica MTT testom

Procjena vijabilnosti stanica izvršena je mjerenjem metaboličke aktivnosti stanica uz tetrazolijevu sol MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolijev bromid) kao supstrat za stanične dehidrogenaze. U živim stanicama dolazi do redukcije MTT-a (žuti supstrat, topiv u vodi) u kristale formazana (tamno plavo obojeni produkti, topivi u organskim otapalima), pa se ovim kolorimetrijskim testom mjeri redukcijski potencijal stanica (Cole, 1986).

Za ovaj test stanice su nasađene na pločice s 96 jažica u odgovarajućem broju i volumenu medija. Stanice su tretirane ekstraktom dima cigareta te inkubirane tijekom 4 h, 24 h ili 48 h na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Kao pozitivna kontrola za smanjenu vijabilnost, stanice su tretirane 20 μM kamptotecinom (Sigma-Aldrich) otopljenim u dimetil-sulfoksidu (DMSO) tako da je konačna koncentracija DMSO u mediju iznosila 0,1 %. Nakon završene inkubacije medij iznad stanica se pažljivo ukloni odsisavanjem vakuum sisaljkom te se u svaku jažicu doda 100 μL razrijeđenog MTT reagensa. Matična otopina MTT se priprema otapanjem 5 mg MTT (Sigma-Aldrich) u 1 mL sterilnog PBS-a, a on se dalje razrjeđuje s RPMI medijem bez seruma tako da je konačna koncentracija 0,5 mg MTT na 1 mL medija. Nakon 3,5 h inkubacije na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2, medij iznad stanica se ukloni i u svaku jažicu se doda po 200 μL DMSO kako bi se otopili kristali formazana nastali redukcijom MTT-a u živim stanicama. Zatim se pločice ostave 15 minuta na tresilici pri 600 okretaja u minuti kako bi se kristalići formazana u potpunosti otopili. Mjerenje apsorbancije na 595 nm vrši se na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR Multilabel Counter 1420, Wallac, Perkin-Elmer). Srednja vrijednost apsorbancija nestimuliranih stanica proglasi se 100 %, a vrijednosti apsorbancija uzoraka izraze kao postotak nestimuliranih stanica. Rezultati se prikažu grafički kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

3.1.7. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze u mediju iznad stanica

Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH) u mediju iznad stanica koristi se kao pokazatelj integriteta stanične membrane i služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari.

Za ovu analizu stanice su nasađene na pločice s 12 jažica u odgovarajućem broju i volumenu medija. Stanice su tretirane ekstraktom dima cigareta te inkubirane tijekom 4 h ili 24 h na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Kao pozitivna kontrola stanice su tretirane 30 μM kamptotecinom (Sigma-Aldrich) otopljenim u DMSO tako da je konačna koncentracija DMSO u mediju iznosila 0,1 %. Nakon završene inkubacije medij iznad stanica se centrifugira na 1000 g tijekom 5 minuta na +4˚C, a LDH u dobivenom nadsloju se odmah odredi na poluautomatskom biokemijskom analizatoru Trace 30 uz upotrebu reagensa za određivanje LDH (Herbos Dijagnostika d.o.o.). Omjer uzorka i reagensa u reakcijskoj smjesi je 1:60. Princip ove metode temelji se na oksidaciji L-laktata u piruvat u prisustvu LDH pri čemu se NAD^+ reducira te se kontinuirano mjeri porast apsorbancije NADH na 340 nm pri

37˚C prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij (U/L) ± standardna pogreška.

3.1.8. Određivanje apoptoze / nekroze protočnom citometrijom

Bojanje stanica aneksinom V obilježenom fluorescentnom bojom i propidijevim jodidom omogućava razlikovanje stanica u ranoj apoptozi i nekroznih stanica od živih stanica (Vermes i sur., 1995). Aneksin V je protein koji se u prisustvu kalcijevih iona čvrsto veže za fosfatidil-serin premješten s unutrašnje na vanjsku ovojnicu membrane stanica u ranoj apoptozi. Obilježavanje aneksina V fluorescentnom bojom ili biotinom omogućava identifikaciju apoptoznih stanica. Nekrozne stanice također na staničnoj membrani imaju izložen fosfatidil-serin, pa da bismo ih razlikovali od apoptoznih, stanice istovremeno bojimo i propidijevim jodidom koji ulazi samo u nekrozne stanice i u njima se veže na nukleinske kiseline, te one fluoresciraju crveno. Stanice obilježene fluorescentnim bojama moguće je detektirati protočnim citometrom.

Za ovu analizu stanice su nasađene na pločice s 12 jažica u odgovarajućem broju i volumenu medija. Stanice su tretirane ekstraktom dima cigareta te inkubirane tijekom 4 h ili 24 h na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Kao pozitivna kontrola za apoptozu stanice su tretirane 20 μM kamptotecinom (Sigma-Aldrich) otopljenim u DMSO tako da je konačna koncentracija DMSO u mediju iznosila 0,1 %. Svi koraci analize izvode se na ledu. Medij iznad stanica se prenese u epruvetice i centrifugira na 400 g tijekom 5 minuta na +4˚C. Stanice koje su bile odlijepljene od podloge ostaju u talogu. Na adherirane stanice se doda po 200 μL tripsina i ostavi 5 minuta u inkubatoru na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Djelovanje tripsina zaustavi se dodatkom 800 μL kompletnog RPMI medija u svaku jažicu. Stanice iz svake jažice se resuspendiraju pipetom, prenesu u epruvetice u kojima se nalazi talog stanica iz medija i centrifugiraju 5 minuta na 400 g na +4˚C. Nadsloj se ukloni, a talog stanica se resuspendira u otprilike 600 μL RPMI medija bez seruma tako da je konačna koncentracija stanica otprilike 1 x 10^6 stanica / mL. Neposredno prije analize pripremi se kalcijev pufer razrjeđivanjem 10x koncentrirane otopine (0,1 M HEPES, 1,4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O). 100 μL suspenzije stanica se prebaci u epruvetu za analizu na protočnom citometru, doda se 100 μL razrijeđenog kalcijevog pufera, 0,5 μL aneksina V obilježenog s Alexa Fluor 488 bojom (Invitrogen) i 0,2 μL propidijevog jodida koncentracije 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich) te se analiza na protočnom citometru Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter) provede unutar jednog sata.

3.1.9. Određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina

Koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina određuje se upotrebom Ellmanovog reagensa (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina ili DTNB) (Ellman, 1958). U reakciji slobodnih tiolnih skupina s DTNB oslobađa se 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) i nastaju miješani disulfidi (između molekule sa slobodnom tiolnom skupinom i TNB). Reakcija se odvija brzo i stehiometrijski, jedan mol tiola oslobađa jedan mol TNB. TNB u vodenoj sredini pri alkalnom i neutralnom pH ionizira u žuto obojeni anion TNB^-. Oslobođeni TNB^- se određuje spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na 412 nm.

Stanice koje su rasle na pločicama sa 6 jažica tretirane su ekstraktom dima cigareta te inkubirane tijekom 4 h ili 24 h na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Nakon završenog tretiranja stanice su lizirane sonikacijom. Reakcijska smjesa (ukupnog volumena 1 mL) za određivanje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina sastojala se od 100 µL lizata stanica, 150 µL pufera (0,25 mol/L Tris-HCl, pH 8,2 koji je sadržavao 20 mmol/L EDTA), 10 µL DTNB (10 mmol/L DTNB otopljen u apsolutnom metanolu) i 740 µL apsolutnog metanola. Slijepa proba uzorka sadržavala je 100 µL lizata stanica, 150 µL pufera, 10 µL destilirane vode i 740 µL apsolutnog metanola, dok je slijepa proba reagensa sadržavala 100 µL vode, 150 µL pufera, 10 µL DTNB i 740 µL apsolutnog metanola. Reakcijske smjese se dobro promiješaju i inkubiraju 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se centrifugiraju na 3000 g tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbancija nadsloja mjeri se na 412 nm na spektrofotometru CECIL Aquarius CE 7200 prema destiliranoj vodi. Koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina, izražena u µmol/L, izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$c = \frac{(A-B-C) \times 10^6 \times V}{\varepsilon_{412} \times d \times v} = \frac{(A-B-C) \times 10^6 \times 1\ mL}{14150\ mol^{-1}\ L\ cm^{-1} \times 1\ cm \times 0{,}1\ mL} = (A-B-C) \times 706{,}7\ \mu mol/L$$

gdje je 10^6 = faktor za preračunavanje mol/L u µmol/L, V = volumen reakcijske smjese (1 mL), v = volumen uzorka (0,1 mL), ε_{412} = molarni apsorpcijski koeficijent (TNB^-) (14150 mol^{-1} L cm^{-1}), d = debljina kivete (1 cm), A = apsorbancija probe na 412 nm, B = apsorbancija slijepe probe reagensa na 412 nm, a C = apsorbancija slijepe probe uzorka na 412 nm.

Koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina u lizatu A549 stanica izloženih ekstraktu dima cigareta izražena je na koncetraciju ukupnih proteina u uzorku (µmol tiola / g proteina).

3.1.10. Određivanje koncentracije malondialdehida

Koncentracija malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije, određena je modificiranom metodom koju su opisali Drury i suradnici (1997). Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje crveni kompleks MDA-TBA koji se određuje pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, od eng. *high performance liquid chromatography*). MDA u kiselim uvjetima reagira s TBA u omjeru 1:2. Specifičnost reakcije povećava se upotrebom antioksidansa butiliranog hidroksitoluena (BHT) i korištenjem HPLC-a koji omogućava odvajanje kompleksa MDA-TBA od ostalih komponenti u reakcijskoj smjesi koje također apsorbiraju na istoj valnoj duljini.

Stanice koje su rasle na pločicama sa 6 jažica tretirane su ekstraktom dima cigareta te inkubirane tijekom 4 h ili 24 h na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Nakon završenog tretiranja stanice su lizirane sonikacijom. Za određivanje koncentracije MDA na 50 µL lizata stanica doda se 5 µL 0,2 % BHT (Sigma-Aldrich) otopljenog u 96 % etanolu (Kemika) i 750 µL 1 % fosforne kiseline (Kemika). Sadržaj epruvete se promiješa te se doda 250 µL 0,6 % TBA (Sigma-Aldrich) i 445 µL ultračiste vode. Reakcijska smjesa se ponovno promiješa te se inkubira u vodenoj kupelji na 100˚C tijekom 30 minuta. Reakcija se zaustavi uranjanjem epruveta u hladnu vodu. Uzorci se prebace u automatski ubacivač uzoraka koji je temperiran na 15˚C i ubacuje po 20 µL uzorka u HPLC (Shimadzu Corporation). HPLC se temelji na sustavu koji se sastoji od visokotlačne pumpe koja potiskuje mobilnu fazu (otapalo) s uzorkom preko stacionarne faze na kojoj se tvari razdvajaju i izlaze u različitim retencijskim vremenima, a njihov izlazak bilježi detektor. Mobilna faza sastojala se od 50 mmol/L KH_2PO_4 (Merck) i metanola HPLC čistoće (Kemika) u omjeru 60:40, a pH mobilne faze podešen je na 6,8. Neposredno prije korištenja, mobilna faza se stavi u ultrazvučnu kupelj u trajanju od 15 minuta kako bi iz nje izašao zrak. Protok mobilne faze podešen je na 1 mL/min. Korištena pretkolona i analitička kolona su kolone obrnute faze C-18 (LiChrospher, Merck) s česticama veličine 5 µm. Dimenzije pretkolone su 4,0 x 4,0 mm, a analitičke kolone 4,0 x 125,0 mm. Analitička kolona je temperirana na 32˚C tijekom analize. Valna duljina UV/VIS detektora je podešena na 532 nm, a vrijeme zadržavanja MDA na analitičkoj koloni je bilo 2,5 minute. Koncentracija MDA u uzorku odredi se pomoću baždarnog dijagrama standarda 1,1,3,3-tetrametoksi propana (Sigma-Aldrich) poznate koncentracije. Dobivena koncentracija MDA izražava se u µmol/L.

Koncentracija MDA u lizatu A549 stanica izloženih ekstraktu dima cigareta izražena je na koncetraciju ukupnih proteina u uzorku (μmol MDA / g proteina).

3.1.11. Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Proteini iz staničnih lizata, pripremljenih uz upotrebu pufera za liziranje stanica, razdvoje se okomitom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Za elektroforezu proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu korišten je 4 %-tni sabijajući gel te 10 %-tni razdvajajući gel (pri analizi ubikvitin-proteinskih konjugata i aktivacije eIF2α), odnosno 12 %-tni razdvajajući gel (pri analizi aktivacije MAPK i ekspresije HSP). Sastav 4 %-tnog sabijajućeg gela je bio 6,1 mL ultračiste H_2O, 2,5 mL pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), 100 μL 10 % otopine SDS, 1,3 mL 30 % otopine akrilamid / bis-akrilamid, 50 μL 10 % otopine amonijevog persulfata i 10 μL TEMED (tetrametil etilen diamin). Za 10 %-tni razdvajajući gel korišteno je 4,35 ml ultračiste H_2O, 2,5 mL pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100 μL 10 % otopine SDS, 3,0 mL 30 % otopine akrilamid / bis-akrilamid, 50 μL 10 % otopine amonijevog persulfata i 5 μL TEMED, dok se za pripremu 12 %-tnog razdvajajućeg gela razlikovala jedino količina ultračiste H_2O (3,35 mL) i 30 % otopine akrilamid / bis-akrilamid (4,0 mL).

Uzorci se nanesu na gel u volumenu koji odgovara koncentraciji proteina od 20 ili 30 μg. Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,25 M glicin, 0,1 % otopina SDS) uz napon od 100 V tijekom otprilike 1,5 h. Kao standard za približno određivanje molekulske mase proteina korišten je standard proteina (Novex Sharp, Invitrogen) koji je na gelu davao 12 obojenih proteinskih vrpci u rasponu od 3,5 do 260 kDa.

3.1.12. Western blot analiza

Proteini razdvojeni elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu prenesu se na nitroceluloznu membranu. Zatim se membrana zasiti puferom za blokiranje kako bi se u daljnim koracima analize spriječilo nespecifično vezanje protutijela. Nakon toga se membrana inkubira s primarnim protutijelom koje specifično prepoznaje ciljni protein. Na primarna protutijela vežu se sekundarna protutijela koja prepoznaju epitop na primarnom protutijelu, a na sebi imaju vezan enzim peroksidazu iz hrena. Taj enzim u prisustvu kemiluminiscencijskog supstrata emitira svjetlo na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela na membrani, te se prislanjanjem membrane na film ta mjesta vide kao zatamnjene pruge.

Elektroforezom razdvojeni proteini prenijeti su na nitroceluloznu membranu u uređaju za elektro-prijenos proteina (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) pri jakosti struje od 250 mA tijekom 1,5 h. Kako bi se provjerilo jesu li uzorci naneseni na gel sadržavali jednaku koncentraciju proteina i je li postignuta ujednačenost prijenosa proteina na membranu, gelovi su bojani 0,1 % otopinom boje Coomassie briljant plavo R-250 u smjesi 40 % metanola i 10 % octene kiseline. Višak boje uklonjen je korištenjem otopine za odbojavanje (40 % metanola i 10 % octene kiseline u destiliranoj vodi). Ujednačenost prisustva proteina u različitim uzorcima očitana je vizualno.

Nespecifično vezanje protutijela na slobodna mjesta na membrani spriječeno je inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Pri analizi ubikvitin-proteinskih konjugata, aktivacije eIF2α i ekspresije HSP kao pufer za blokiranje korišteno je 5 % obrano mlijeko u prahu u puferu za ispiranje (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20 u ultračistoj vodi), dok je pri analizi aktivacije MAPK korišten 1 % goveđi serumski albumin i 1 % kokošji albumin u puferu za ispiranje.

Membrana je zatim inkubirana s razrijeđenim primarnim protutijelom preko noći na +4˚C:

- za detekciju **ubikvitin-proteinskih konjugata** korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram cijelog aminokiselinskog slijeda (1-76) ubikvitina porijeklom iz goveda (Ub (P4D1): sc-8017; Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:500 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % obranog mlijeka u prahu)
- za detekciju **ukupnog proteina eIF2α** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram sintetskog peptida koji odgovara aminokiselinskom slijedu na C-kraju eIF2α proteina (eIF2α Antibody; #9722; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:500 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % obranog mlijeka u prahu)
- za detekciju **fosforiliranog eIF2α** na poziciji Ser51 korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram sintetskog fosfopeptida koji odgovara aminokiselinskom slijedu oko Ser51 ljudskog eIF2α (Phospho-eIF2α (Ser51) Antibody; #9721; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:500 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % obranog mlijeka u prahu)
- za detekciju **ukupnog proteina ERK** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara aminokiselinskom slijedu na C-kraju ERK1

štakora, koja detektiraju ERK1 i ERK2 kinazu (ERK 1 (C-16): sc-93; Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % goveđeg serumskog albumina i 1 % kokošjeg albumina)

- za detekciju **dvojno-fosforilirane ERK** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog Thr-Glu-Tyr područja aktivnih oblika ERK1 i ERK2 kinaza (Anti-ACTIVE MAPK pAb, Rabbit, (pTEpY); #V8031; Promega) (razrjeđenje 1:5000 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % goveđeg serumskog albumina i 1 % kokošjeg albumina)
- za detekciju **ukupnog proteina p38** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara aminokiselinskom slijedu na C-kraju p38 miša (p38α (C-20): sc-535; Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % goveđeg serumskog albumina i 1 % kokošjeg albumina)
- za detekciju **dvojno-fosforilirane p38** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog Thr-Gly-Tyr područja aktivnog oblika ljudske p38 kinaze (Anti-ACTIVE p38 pAb, Rabbit, (pTGpY); #V1211; Promega) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % goveđeg serumskog albumina i 1 % kokošjeg albumina)
- za detekciju **ukupnog proteina JNK** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram cijelog aminokiselinskog slijeda (1-384) JNK1 čovjeka, koja detektiraju JNK1 i JNK2 (JNK (FL): sc-571; Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % goveđeg serumskog albumina i 1 % kokošjeg albumina)
- za detekciju **dvojno-fosforilirane JNK** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog Thr-Pro-Tyr područja aktivnih oblika JNK1 i JNK2 kinaze (Anti-ACTIVE JNK pAb, Rabbit, (pTPpY); #V7931; Promega) (razrjeđenje 1:5000 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % goveđeg serumskog albumina i 1 % kokošjeg albumina)
- za detekciju **HSP70 proteina** korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram nativnog ljudskog HSP70 proteina (HSP70/HSP72, mAb (C92F3A-5); #ADI-SPA-810; Stressgen; Enzo Life Sciences) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje)

- za detekciju **HSP32 proteina** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram rekombinantnog ljudskog HSP32 proteina (HO-1, pAb; #ADI-SPA-894; Stressgen; Enzo Life Sciences) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje)
- za detekciju **HSP27 proteina** korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram rekombinantnog ljudskog HSP27 proteina (HSP27, pAb; #ADI-SPA-803; Stressgen; Enzo Life Sciences) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje)
- za detekciju **β-aktina** korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram aktina iz ptičjeg želuca (β-Actin (C4): sc-47778; Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:200 u puferu za ispiranje).

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, membrana se ispere puferom za ispiranje (3 x 15 minuta) te se inkubira sa sekundarnim protutijelom tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Korištena su sljedeća sekundarna protutijela:

- za detekciju **mišjih protutijela** (pri analizi ubikvitin-proteinskih konjugata) korištena su poliklonska protutijela iz seruma kunića imuniziranog imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP; RaMPo; Dako) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % obranog mlijeka u prahu)
- za detekciju **kunićjih protutijela** (pri analizi aktivacije eIF2α) korištena su poliklonska protutijela iz seruma koze imunizirane imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / HRP; GaRPo; Dako) (razrjeđenje 1:500 u puferu za ispiranje uz dodatak 1 % obranog mlijeka u prahu)
- za detekciju **kunićjih protutijela** (pri analizi aktivacije MAPK i ekspresije HSP32 i HSP27) korištena su protutijela iz seruma magarca imuniziranog imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma (ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from donkey); #NA934; Amersham; GE Healthcare) (razrjeđenje 1:5000 u puferu za ispiranje)
- za detekciju **mišjih protutijela** (pri analizi ekspresije HSP70 i β-aktina) korištena su protutijela iz seruma ovce imunizirane imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma (ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep); #NA931; Amersham; GE Healthcare) (razrjeđenje 1:5000 u puferu za ispiranje).

Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membrana se ispere puferom za ispiranje (3 x 15 minuta, a nakon toga još 2 x 10 minuta) te se vizualizacija proteina postiže inkubacijom membrane tijekom 1 minute u mraku s komercijalno dostupnim reagensom za pojačanu kemilumini-scenciju (ECL Western Blotting Detection Reagents; #RPN2134; GE Healthcare) ili istim reagensom pripravljenim u laboratoriju (5 mg luminola (Sigma-Aldrich), 1 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 14 mL ultračiste H_2O, 5 μL H_2O_2, 150 μL pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich) u 10 mL DMSO). Zatim se membrana izloži filmu (Hyperfilm ECL 18 x 24 cm; #28-9068-36; GE Healthcare) u vremenu ovisnom o intenzitetu signala. Film se razvije upotrebom kemikalija za razvijanje autoradiografskih filmova (GBX developer/replenisher i GBX fixer/replenisher; Kodak; Sigma-Aldrich). Intenzitet signala proteina pri analizi aktivacije MAPK i ekspresije HSP izmjeren je denzitometrijskom analizom filmova uz upotrebu programa Scion Image za Windows-e (Scion Corporation). Rezultati denzitometrijske analize dobivenih vrpci izraženi su u relativnim denzitometrijskim jedinicama. Za detekciju signala kod analize ubikvitin-proteinskih konjugata, β-aktina i aktivacije eIF2α korišten je Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories).

3.1.13. Mjerenje *de novo* sinteze proteina

Sinteza proteina u A549 stanicama izloženim dimu cigareta izmjerena je upotrebom kompleta reagensa Click-iT Cell Reaction Buffer Kit (Invitrogen). Nakon izlaganja stanica dimu cigareta tijekom 1 ili 5 minuta, stanice su inkubirane idućih 4 h. Tako tretirane stanice isperu se RPMI medijem bez L-metionina (Invitrogen) te resuspendiraju u RPMI mediju bez L-metionina koji sadržava 25 μmol/L L-azidohomoalanina, aminokiselinu koja je analog metioninu (Invitrogen). Stanice se vrate u inkubator tijekom sljedeća 4 h. Nakon završene inkubacije, stanice se isperu s PBS-om i podignu od podloge koristeći 0,05 % tripsin-EDTA 1x (Invitrogen). Suspenzija stanica fiksira se 4 %-tnim paraformaldehidom (Sigma-Aldrich) tijekom 15 minuta, nakon čega slijedi permeabiliziacija uz upotrebu 0,25 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) u PBS-u tijekom 20 min. Zatim se stanice isperu 3 %-tnim govođim serumskim albuminom (Sigma-Aldrich) u PBS-u i resuspendiraju u Click-iT reakcijskoj smjesi (Click-iT Cell Reaction pufer, $CuSO_4$ i dodatak puferu). Uzorci se inkubiraju tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeni od svjetla. Nakon završene inkubacije stanice se isperu 3 %-tnim govođim serumskim albuminom u PBS-u, obojaju Alexa Fluor 488 fluorescentnom bojom (Invitrogen) i analiziraju upotrebom FACSCalibur protočnog citometra

(Becton Dickinson). Stanice izložene cikloheksimidu (inhibitor sinteze proteina) u konačnoj koncentraciji od 10 μmol/L služile su kao pozitivna kontrola.

3.1.14. Određivanje slobodnih aminokiselina tekućinskom kromatogafijom - spektrometrijom masa (LC/MS)

Slobodne aminokiseline određene su obilježavanjem s esterima polietilenglikolnih derivata aktiviranima pentafluorofenilom (PEG-OPFP) i analizirane tekućinskom kromatogafijom - spektrometrijom masa (eng. *liquid chromatography - mass spectrometry*, LC/MS) prema prethodno opisanoj metodi (Abello i sur., 2008). Stanice se isperu PBS-om i odvoje od podloge upotrebom Cell Dissociation pufera (Invitrogen). Zatim se dva puta isperu s po 10 mL PBS-a uz centrifugiranje na 560 g tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice se potom resuspendiraju u 1 ml 100 mmol/L natrijevog fosfatnog pufera pH 8,0 koji sadržava 1 mmol/L EDTA te liziraju sonikacijom. Tako pripremljenim lizatima stanica odmah se doda 1 mM fenilmetansulfonilfluorid (inhibitor serinskih proteaza; Sigma-Aldrich) otopljen u DMSO. Neotopljeni stanični materijal ukloni se centrifugiranjem na 20000 g tijekom 45 minuta na +4˚C. Dobiveni supernatant filtrira se kroz Ultrafree-0.5 filtere za centrifugiranje s Biomax-5 membranom (Merck Millipore). Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976), uz goveđi serumski albumin kao standard. Svaki uzorak razrijedi se u 100 mmol/L natrijevom fosfatnom puferu pH 8,0 koji sadržava 1 mmol/L EDTA kako bi konačna koncentracija iznosila 50 mM. 180 μL svakog uzorka obilježi se s 10 μL 5 mM PEG-OPFP otopljenog u DMSO te inkubira 10 minuta na tresilici na 450 okretaja u minuti pri sobnoj temperaturi. PEG-OPFP obilježivači su sadržavali 0, 2, 6 ili 8 atoma ^{13}C ovisno o tome jesu li uzorci bili izloženi zraku, epoksomicinu (inhibitor aktivnosti proteasoma; Sigma-Aldrich), dimu cigareta ili kombinaciji epoksomicina i dima cigareta. Uzorci su podijeljeni u četiri skupine prema tipu tretiranja i 20 μL slučajno odabranog uzorka iz svake od četiri skupine je promiješano i analizirano metodom nano-LC/MS (Agilent Technologies). Integracija dobivenih pikova je napravljena upotrebom programa QuantAnalysis 1.8 / Bruker Daltonics Dana Analysis 3.4 (Bruker Daltonics). Pikovi su definirani prema njihovim *m*/*z* vrijednostima ± 0,5 Da na temelju jednostrukog naboja i njihovim retencijskim vremenima ± 0,5 minuta u usporedbi sa standardnom otopinom derivatiziranih aminokiselina. Integracija pikova je ručno provjerena u odabranim uzorcima. Vrijednosti površine pikova za svaku aminokiselinu su normalizirane s obzirom na koncentraciju ukupnih proteina.

3.1.15. Detekcija aktivnih mjesta na podjedinicama proteasoma

Podjedinice proteasoma analizirane su upotrebom metode u kojoj se aktivna mjesta na podjedinicama proteasoma (β1 - kaspazno, β2 - tripsinsko i β5 - kimotripsinsko) obilježavaju fluorescentnom bojom što se detektira u samom gelu na kojem se uzorci elektroforetski razdvoje (Verdoes i sur., 2006). Lizati stanica pripremljeni su dodatkom lizirajućeg pufera koji sadržavao 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$, 250 mM saharozu i 2 mM ATP. Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Podjedinice proteasoma (β1, β2 i β5) obilježe se tako da se 10 μg proteina iz lizata stanica inkubira tijekom 1 h na 37°C s 1 μmol/L inhibitorom proteasoma MV151 (Bodipy TMR-Ahx(3)L(3)VS) koji se veže samo na aktivna mjesta, a obilježen je fluorescentnom bojom, u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 10 μl. Zatim su ti uzorci prokuhaju tijekom 3 minute uz Laemmlijev pufer i razdvoje elektroforezom u 12,5 %-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu. Vizualizacija aktivnih mjesta na podjedinicama proteasoma u gelu izvrši se upotrebom Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories), uz valnu duljinu ekscitacije 532 nm i emisije 555 nm LP. Kao pozitivna kontrola gubitka aktivnih mjesta na podjedinicama proteasoma služili su lizati stanica izloženi 1 μmol/L epoksomicinu tijekom 1 h neposredno prije inkubacije s MV151.

3.1.16. Mjerenje aktivnosti proteasoma

Aktivnosti proteasoma izmjerene su koristeći metodu u kojoj se tri različite aktivnosti proteasoma (kaspazna, tripsinska i kimotripsinska) mjere uz upotrebu specifičnih fluorescentno obilježenih supstrata (Verdoes i sur., 2006). Lizati stanica pripremljeni su kao i za analizu aktivnih mjesta na podjedinicama proteasoma. 25 μg proteina iz lizata stanica pomiješa se sa 100 μL pufera koji sadržava 20 mM HEPES pH 8,2, 0,5 mM EDTA, 1 % DMSO, 1 mM ATP (Sigma-Aldrich) i 50 μM supstrat Z-Leu-Leu-Glu-AMC (za kaspaznu aktivnost; Calbiochem, Merck Millipore), 50 μM supstrat Ac-Arg-Leu-Arg-AMC (za tripsinsku aktivnost; Boston Biochem Inc.) ili 50 μM supstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (za kimotripsinsku aktivnost; Calbiochem, Merck Millipore). Odvajanje fluorescentne skupine mjeri se svakih 30 sekundi tijekom 15 minuta na 37°C upotrebom FL600 fluorescentnog čitača pločica (Bio-Tek Instruments), uz valnu duljinu ekscitacije 360 nm i emisije 460 nm. Prosječna promjena fluorescencije tijekom 15 minuta korištena je za računanje specifičnih aktivnosti proteasoma u svakom uzorku. Kao pozitivna kontrola inhibicije aktivnosti proteasoma služili su lizati stanica izloženi 1 μmol/L epoksomicinu.

3.1.17. Određivanje koncentracije MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 u lizatima i mediju iznad A549 stanica

Koncentracija MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 u lizatima i mediju iznad A549 stanica izloženih ekstraktu dima cigareta određena je upotrebom komercijalno dostupnih kompleta reagensa za enzimske imunokemijske analize (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) (#DMP2F0, #DMP900 i #DTM100; Quantikine, R&D Systems). Za sva tri kompleta reagensa princip je zajednički, a uključuje kvantitativni enzimski imunotest na čvrstoj fazi. Poliklonska protutijela specifična za MMP-2, odnosno monoklonska protutijela specifična za MMP-9 ili TIMP-1 nalaze se vezana na donjoj površini svake jažice na pločicama. Standardi poznatih koncentracija i uzorci se nanesu u jažice i prisutne molekule MMP-2, MMP-9 ili TIMP-1 se čvrsto vežu na ta protutijela. Nakon ispiranja nevezanih tvari, doda se poliklonsko protutijelo (koje na sebi ima vezanu peroksidazu iz hrena) također specifično za MMP-2, MMP-9 ili TIMP-1. Postupak ispiranja se ponovi kako bi se uklonio višak protutijela konjugiranih s enzimom. Zatim se u jažice doda svježe pripremljena otopina supstrata (H_2O_2 i kromogen tetrametilbenzidin) i nastaje obojenje proporcionalno količini MMP-2, MMP-9 ili TIMP-1 vezanih u prvom koraku. Reakcija se zaustavi dodatkom sumporne kiseline, a intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski na 450 nm (s korekcijom optičke nesavršenosti pločice na 540 nm) na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR Multilabel Counter 1420, Wallac, Perkin-Elmer). Koncentracije MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 se odrede iz baždarne krivulje. Osjetljivost upotrijebljenih ELISA testova je redom: 0,047 ng/mL za MMP-2, 0,156 ng/mL za MMP-9 i 0,080 ng/mL za TIMP-1, dok je linearnost do najviše 50 ng/mL za MMP-2, 20 ng/mL za MMP-9 i 10 ng/mL za TIMP-1. ELISA test za MMP-2 prepoznaje pro- i aktivni oblik MMP-2 te mjeri slobodnu, ali ne i ukupnu MMP-2 (zbog interferencije s TIMP-2 pri koncentracijama $\geq$ 0,8 ng/mL). ELISA test za MMP-9 prepoznaje pro- i aktivni oblik MMP-9 (zabilježena je jedino interferencija s rekombinantnim TIMP-1 pri koncentracijama $\geq$ 6,25 ng/mL). ELISA test za TIMP-1 mjeri TIMP-1 (zabilježena je jedino interferencija s rekombinantnom MMP-9 pri koncentracijama $\geq$ 100 ng/mL).

Kako je preliminarni pokus pokazao vrlo niske koncentracije MMP-2 i MMP-9, odnosno koncentracije na granici detekcije, uzorci lizata i medija za analizu MMP-2 i MMP-9 su ukoncentrirani upotrebom Amicon Ultra-2 filtera za centrifugiranje s Ultracel-10 membranom (Merck Millipore). Uzorci lizata i medija stavljeni su u epruvete s filterom te centrifugirani 10 minuta na 7500 g na sobnoj temperaturi u centrifugi s fiksnim rotorom. Filtrati su odbačeni, a ukoncentrirani uzorci spušteni u sabirne epruvete centrifugiranjem na 1000 g tijekom 2

minute. Ukoncentrirani uzorci lizata i medija pohranjeni su na -20˚C do određivanja koncentracija MMP-2, MMP-9 i proteina.

Koncentracije su izražene na koncetraciju ukupnih proteina u uzorku (ng/mg proteina).

3.1.18. Statistička obrada podataka dobivenih u *in vitro* ispitivanjima

Western blot analize napravljene su u uzorcima dobivenim iz tri neovisna pokusa. Ostali pokusi izvedeni su u tri ili više istovremenih tretiranja za svaku koncentraciju ekstrakta dima cigareta. Dobiveni rezultati analizirani su upotrebom programa SigmaStat za Windows-e, verzija 3.00 (SPSS Inc.) ili Prism 4 za Windows-e, verzija 4.03 (GraphPad Software Inc.). Normalnost raspodjele podataka testirana je *Kolmogorov-Smirnovim testom*. Statističke razlike između skupina koje su pokazale normalnu raspodjelu testirane su parametrijskim testom za usporedbu više od dvije skupine podataka (jednosmjerna analiza varijance, eng. *One Way Analysis of Variance*, ANOVA), dok su kod skupina koje nisu pokazale normalnu raspodjelu statističke razlike testirane neparametrijskim testom za usporedbu više od dvije skupine podataka (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*). *Post hoc* analize provedene su *Dunettovim testom značajnosti*. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Za statistički značajne razlike uzeta je vrijednost $P<0,05$.

3.2. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na uzorcima od ukupno 137 bolesnika s KOPB-om i 48 zdravih ispitanika. Istraživanje su odobrila etička povjerenstva Opće bolnice "dr. Ivo Pedišić" u Sisku i Klinike za plućne bolesti "Jordanovac" Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi ispitanici su bili upoznati s istraživanjem te su potpisali informirani pristanak. Ispitivanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom. Kriteriji isključivanja za bolesnike s KOPB-om i za zdrave ispitanike bile su druge plućne, infekcijske, tumorske, bubrežne, jetrene, gastrointestinalne ili endokrinološke bolesti te pretjerana konzumacija alkohola (≥ 40 g / dan). Prema pušačkom statusu ispitanici su bili definirani kao pušači (oni koji puše više od 2 cigarete na dan i oni koji su prestali pušiti unutar 6 mjeseci od početka istraživanja), bivši pušači (oni koji su pušili tijekom života, ali su prestali pušiti više od 6 mjeseci prije početka istraživanja) i nepušači (oni koji nisu nikada pušili).

3.2.1. Bolesnici s KOPB-om

U istraživanje je bilo uključeno 107 bolesnika s KOPB-om iz Opće bolnice "dr. Ivo Pedišić" u Sisku i 30 bolesnika s Klinike za plućne bolesti "Jordanovac" Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Svi bolesnici bili su u stabilnoj fazi bolesti (bez hospitalizacije i promjene terapije) najmanje 3 mjeseca prije uzimanja uzoraka krvi.

Kriterij za odabir bolesnika s KOPB-om bila je klinička dijagnoza KOPB-a prema GOLD smjernicama (www.goldcopd.org). Dijagnozu su postavljali specijalisti za plućne bolesti na temelju kliničkog pregleda (kronična i progresivna dispneja, kašalj i stvaranje ispljuvka) i spirometrijskih nalaza. Bolesnici su podijeljeni u podskupine prema GOLD smjernicama, ovisno o težini bolesti. Za sve GOLD stadije zajednički kriterij je bio omjer $FEV_1/FVC < 0,70$. Svrstavanje u podskupine temeljilo se na predviđenom FEV_1:

- GOLD II stadij: $50\ \% \leq FEV_1 < 80\ \%$ predviđenog,
- GOLD III stadij: $30\ \% \leq FEV_1 < 50\ \%$ predviđenog,
- GOLD IV stadij: $FEV_1 < 30\ \%$ predviđenog.

3.2.2. Zdravi ispitanici

Kontrolnu skupinu činili su zdravi ispitanici koji su živjeli na području Siska (38 ispitanika) i Zagreba (10 ispitanika). Preporučeni su od strane liječnika obiteljske medicine, bili su dobrog zdravstvenog stanja i imali uredne spirometrijske nalaze.

3.2.3. Uzorci

Svim ispitanicima krv je vađena ujutro natašte u plastične epruvete s podtlakom. Puna krv uzeta na antikoagulans EDTA korištena je za određivanje hematoloških parametara te za izolaciju DNA i utvrđivanje prisutnosti polimorfizama. Za određivanje biokemijskih parametara korišteni su uzorci plazme ili seruma. Plazma je dobivena vađenjem krvi u epruvete s antikoagulansom EDTA te centifugiranjem na 2900 rpm tijekom 10 minuta. Serum je dobiven vađenjem krvi u epruvete bez antikoagulansa te nakon 30 minuta stajanja centrifugiranjem na 3500 rpm tijekom 10 minuta. Uzorci su do izvođenja analiza pohranjeni na -20˚C. Izolacija polimorfonuklearnih leukocita iz pune krvi uzete na Li-heparin kao antikoagulans rađena je odmah po vađenju krvi.

3.2.4. Određivanje koncentracije upalnih biljega

Određivanje broja ukupnih leukocita (x 10^9 / L) te udjela segmentiranih neutrofila, monocita i limfocita (%) u punoj krvi ispitanika izvršeno je upotrebom automatiziranog hematološkog analizatora Cell-Dyn 3200 (Abbott Diagnostics).

Koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) (mg/L) u serumu ispitanika određena je imuno-turbidimetrijskom metodom na analizatoru Dimension Xpand Plus (Siemens Healthcare Diagnostics).

3.2.5. Izolacija polimorfonuklearnih leukocita

Izolacija polimorfonuklearnih leukocita (PMN) iz pune krvi rađena je modificiranom metodom po Bøyumu (Bøyum, 1976). 5 mL svježe pune krvi pomiješa se s 1 mL otopine dekstrana (0,5 g dekstrana (#D1037; Sigma-Aldrich) otopi se u 10 mL 7 g/L NaCl) i ostavi stajati 60 minuta na sobnoj temperaturi u plastičnoj epruveti. Dobiveni gornji sloj plazme bogate leukocitima pažljivo se nadsloji na otopinu Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) sobne temperature u novoj plastičnoj epruveti u omjeru 1:1 te se centrifugira na 400 g tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi (uz ubrzanje na 5 i kočnicu na 0). Dobiveni gornji sloj plazme, srednji sloj mononuklearnih stanica i donji sloj Histopaque-a se uklone, a talog PMN se

resuspendira u 1 mL hladnog 9 g/L NaCl. Zaostali eritrociti se uklone dodatkom 3 mL hladne destilirane vode, miješanjem 45 sekundi te dodatkom 3 mL hladnog 18 g/L NaCl i miješanjem još 45 sekundi. Suspenzija se centrifugira na 500 g tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Postupak se ponovi još dva puta, odnosno sve dok se ne odstrane svi zaostali eritrociti. Na kraju dobiveni talog PMN resuspendira se u 1 mL kompletnog RPMI medija (s 5 % telećeg fetalnog seruma, ali bez antibiotika i antimikotika). Vijabilnost i broj PMN se odredi bojanjem s 0,4 % bojom tripansko plavilo (Sigma-Aldrich). Vijabilnost izoliranih PMN uvijek je bila veća od 95 %.

3.2.6. Izlaganje polimorfonuklearnih leukocita ekstraktu dima cigareta

Od svakog ispitanika po 200000 PMN je nasađeno u duplikatu na pločice sa 6 jažica u ukupnom volumenu medija od 2 mL. PMN u jednoj jažici nisu bili stimulirani, dok su PMN u drugoj jažici bili izloženi svježe pripremljenom ekstraktu dima cigareta u koncentraciji od 4 % tijekom 20 h. Nakon završene inkubacije medij iznad PMN se centrifugira na 1000 g tijekom 5 minuta na +4˚C, a dobiveni nadsloj alikvotira i pospremi na -20˚C za daljnje analize.

3.2.7. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH u mediju iznad polimorfonuklearnih leukocita izloženih ekstraktu dima cigareta

PMN izolirani iz jednog nasumično odabranog zdravog ispitanika nasađeni su na pločicu s 24 jažice. U svaku jažicu nasađeno je 100000 PMN u volumenu medija od 1 mL. Zatim je polovica PMN tretirana svježe pripremljenim ekstraktom dima cigareta u koncentraciji od 4 %. PMN su inkubirani na 37˚C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2 u triplikatu za svaki vremenski period (1 h, 4 h, 20 h ili 22 h). Nakon završene inkubacije medij iznad PMN je centrifugiran na 1000 g tijekom 5 minuta na +4˚C, a LDH u dobivenom nadsloju je odmah određena na poluautomatskom biokemijskom analizatoru Trace 30 uz upotrebu reagensa za određivanje LDH (Herbos Dijagnostika d.o.o.). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij (U/L) **±** standardna pogreška.

3.2.8. Određivanje koncentracije MMP-9 i TIMP-1 u mediju iznad polimorfonuklearnih leukocita izloženih ekstraktu dima cigareta

Koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u mediju određena je upotrebom komercijalno dostupnih ELISA kompleta reagensa (#DMP900 i #DTM100; Quantikine, R&D Systems), čiji princip je opisan pod točkom **3.1.17.** Koncentracije su izražene u ng/mL medija.

3.2.9. Određivanje koncentracije MMP-9 i TIMP-1 u plazmi

Koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u plazmi ispitanika određena je upotrebom komercijalno dostupnih ELISA kompleta reagensa (#RPN2614 i #RPN2611; Amersham; GE Healthcare). Za oba kompleta reagensa princip je zajednički, a uključuje kvantitativni enzimski imunotest na čvrstoj fazi. Protutijela specifična za MMP-9 ili TIMP-1 nalaze se vezana na donjoj površini svake jažice na pločicama. Standardi poznatih koncentracija i uzorci se nanesu u jažice i prisutne molekule MMP-9 ili TIMP-1 se čvrsto vežu na ta protutijela. Nakon ispiranja nevezanih tvari, doda se protutijelo (koje na sebi ima vezanu peroksidazu iz hrena) također specifično za MMP-9 ili TIMP-1, ali koje prepoznaje drugi epitop na ciljnoj molekuli. Postupak ispiranja se ponovi kako bi se uklonio višak protutijela konjugiranih s enzimom. Zatim se u jažice doda supstrat tetrametilbenzidin / H_2O_2 i nastaje obojenje proporcionalno količini MMP-9 ili TIMP-1 vezanih u prvom koraku. Reakcija se zaustavi dodatkom 1,0 M sumporne kiseline, a intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski na 450 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR Multilabel Counter 1420, Wallac, Perkin-Elmer). Koncentracije MMP-9 i TIMP-1 se odrede iz baždarne krivulje. Raspon metode za određivanje MMP-9 u plazmi je 4 - 128 ng/mL (uz osjetljivost metode od 0,6 ng/mL), odnosno 3,13 - 50 ng/mL za TIMP-1 (uz osjetljivost metode od 1,25 ng/mL). ELISA test za MMP-9 mjeri koncentraciju pro-MMP-9 i kompleksa pro-MMP-9/TIMP-1, dok ELISA test za TIMP-1 mjeri ukupni TIMP-1 (slobodni i u kompleksu s MMP).

3.2.10. Izolacija DNA

DNA je izolirana iz pune krvi uzete na antikoagulans EDTA upotrebom komercijalno dostupnog kompleta reagensa za izolaciju DNA (FlexiGene DNA Kit, QIAGEN). Na 1250 μL pufera za liziranje doda se 500 μL pune krvi, sadržaj se promiješa i centrifugira tijekom 6 minuta na 10000 g na sobnoj temperaturi kako bi se istaložile stanične jezgre i mitohondriji. Nadsloj se odlije, a talog posuši tako da se epruvetica kratko ostavi okrenuta naopako na staničevini. Na talog se dodaje 250 μL smjese pufera za denaturaciju (sadrži kaotropne soli) i QIAGEN proteaze (smjesa za jedan uzorak se pripremi tako da se za jedan uzorak pomiješa 2,5 μL proteaze i 250 μL pufera za denaturaciju) te se odmah promiješa sve dok se talog potpuno ne otopi. Nakon toga u uzorke se doda još 30 μL pufera za denaturaciju, reakcijska smjesa se promiješa i inkubira tijekom 10 minuta na 65˚C pri čemu uzorci mijenjaju boju od crvene prema maslinasto zelenoj zbog razgradnje proteina. Zatim se doda po 300 μL 100 % izopropanola i dobro promiješa pri čemu dolazi do taloženja DNA. Reakcijska smjesa se centrifugira tijekom 6 minuta na 10000 g na sobnoj temperaturi, nadsloj se odlije, a talog

DNA osuši tako da se epruvetica kratko ostavi okrenuta naopako na staničevini. Talog DNA se ispere s 250 µL 70 % etanola i istaloži centrifugiranjem tijekom 6 minuta na 10000 g na sobnoj temperaturi. Nadsloj se odlije i talog se osuši na zraku. Na talog DNA doda se 200 µL pufera za hidrataciju (10 mM Tris-HCl pH 8,5) te se DNA otopi inkubacijom na 65˚C preko noći.

3.2.11. Određivanje koncentracije DNA i provjera čistoće

Koncentracija DNA određena je spektrofotometrijskim mjerenjem količine apsorbiranog UV zračenja od strane nukleotidnih baza pri 260 nm. Uzorci DNA razrijeđeni su s destiliranom vodom u omjeru 1:20 te su na spektrofotometru CECIL Aquarius CE 7200 izmjerene apsorbancije na 260 nm prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi. Koncentracija DNA (µg/mL) izračunata je prema formuli $c = A_{260nm} \times 20 \times 50$ µg/mL, uz pretpostavku da apsorbancija od 1,0 pri 260 nm odgovara koncentraciji dvolančane DNA od 50 µg/mL.

Čistoća pripravaka DNA određena je mjerenjem apsorbancije na dvije valne duljine (260 i 280 nm) jer proteini iz uzoraka apsorbiraju na 280 nm. DNA zadovoljavajuće čistoće ima omjer $A_{260\,nm} / A_{280\,nm}$ u rasponu od 1,7 do 1,9.

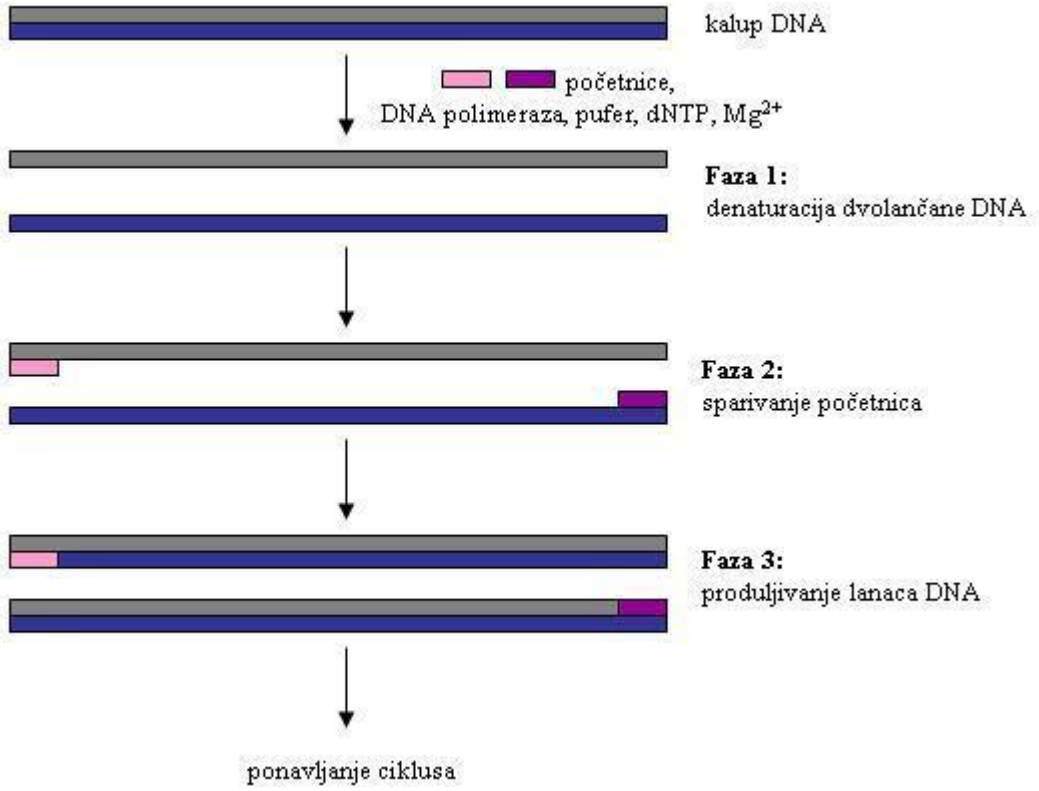
3.2.12. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) je metoda umnažanja određenog fragmenta DNA u veliki broj identičnih kopija u *in vitro* uvjetima korištenjem termostabilnog enzima DNA polimeraze. U reakciji se koristi par kraćih jednolančanih oligonukleotida, tzv. početnice. Početnice omeđuju ciljni fragment DNA koji želimo umnožiti. Jedna početnica je komplementarna 3' kraju fragmenta jednog DNA lanca, a druga početnica je komplementarna 3' kraju drugog DNA lanca koji se umnaža. Reakcijska smjesa uz kalup DNA, par početnica i DNA polimerazu, sadrži i odgovarajući pufer za PCR, smjesu četiriju deoksinukleozid-trifostata (dNTP) u jednakom omjeru (deoksiadenozin-5'-trifosfat, dATP; deoksigvanozin-5'-trifosfat, dGTP; deoksicitidin-5'-trifosfat, dCTP; deoksitimidin-5'-trifosfat, dTTP) te magnezijeve ione. Reakcija PCR se odvija u tri faze (slika 3.2.):

1. denaturacija dvolančane DNA u dva jednolančana lanca,
2. sparivanje početnica s DNA lancima,
3. produljivanje lanaca DNA.

Ciklusi denaturacije, sparivanja početnica i produljivanja lanaca ponavljaju se mnogo puta u uređaju za PCR (eng. *thermocycler*), što rezultira eksponencionalnim rastom količine

umnožene DNA. U konačnici nastaje 2^n kopija fragmenta DNA koji se umnaža, gdje "n" predstavlja broj ciklusa reakcije.



Slika 3.2. Princip lančane reakcije polimerazom (PCR).

Fragmenti DNA koji sadrže polimorfno mjesto -1562 C/T (u promotorskoj regiji *MMP9* gena) umnoženi su kombinacijom PCR metoda koje su opisali Zhang i suradnici (1999a) te Ito i suradnici (2005).

Fragmenti DNA koji sadrže uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ (u promotorskoj regiji *MMP9* gena) umnoženi su modificiranom PCR metodom koju su opisali Shimajiri i suradnici (1999) uz upotrebu početnica koje su u svom istraživanju koristili Tesfaigzi i suradnici (2006).

Fragmenti DNA koji sadrže polimorfno mjesto Q279R (u egzonu 6 *MMP9* gena) umnoženi su kombinacijom PCR metoda koje su opisali Zhang i suradnici (1999b), Kim i suradnici (2002), te Nanni i suradnici (2007).

Reakcijska smjesa za umnožavanje pojedinačnih polimorfnih fragmenata DNA (ukupnog volumena 25 μL) sadržavala je 100 ng genomske DNA, 1x reakcijski pufer za PCR (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4 i 50 mmol/L KCl) (Invitrogen), 2,0 mmol/L $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,2

mmol/L svakog dNTP (Invitrogen), 0,4 μmol/L svake početnice za polimorfizam -1562 C/T i uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$, odnosno 0,5 μmol/L svake početnice za polimorfizam Q279R te 1 jedinicu Platinum *Taq* DNA polimeraze (Invitrogen). Nukleotidni slijedovi korištenih početnica (Applied Biosystems) prikazani su u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Nukleotidni slijedovi početnica korištenih za detekciju polimorfnih mjesta *MMP9* gena.

polimorfizam	**početnica**
-1562 C/T	F: 5'-GCCTGGCACATAGTAGGCCC-3' R: 5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'
uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$	F: 5'-6FAM-AAGCCCTTTCTCATGCTGGTGC-3' R: 5'-TGACAGGCAAGTGCTGACTCAG-3'
Q279R	F: 5'-CTCGCCCCAGGACTCTACAC-3' R: 5'-GTGGAGGTACCTCGGGTCGGG-3'

Umnožavanje DNA provedeno je u uređaju za PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) prema uvjetima prikazanim u tablici 3.2. Dobiveni PCR produkti ostave se najmanje 10 minuta u uređaju za PCR na +4˚C.

Tablica 3.2. Uvjeti za provođenje PCR metode.

polimorfizam	**-1562 C/T**		**uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$**		**Q279R**	
uvjeti za PCR	temperatura	vrijeme	temperatura	vrijeme	temperatura	vrijeme
početna denaturacija	94˚C	5 min	95˚C	5 min	95˚C	10 min
denaturacija	94˚C	30 s	95˚C	30 s	95˚C	1 min
sparivanje početnica	65˚C	30 s	65˚C	30 s	62˚C	1 min
produljivanje lanca	72˚C	30 s	72˚C	30 s	72˚C	1 min
broj ciklusa	**35 ciklusa**		**23 ciklusa**		**35 ciklusa**	
konačno produljivanje lanca	72˚C	7 min	72˚C	30 min	72˚C	5 min
veličina PCR produkta	435 pb		*		194 pb	

* oko 100 pb, ovisno o broju uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$

Pravilan odabir početnica i prisustvo polimorfnog mjesta unutar fragmenta kojeg omeđuju početnice potvrđeni su sekvenciranjem uzoraka (tvrtka Macrogen Inc.) koji su sadržavali umnožene PCR produkte CC i TT genotipa za -1562 C/T polimorfizam, odnosno AA i GG genotipa za Q279R polimorfizam (prilog B). PCR produkti CC i TT genotipa sekvencirani su u oba smjera (prema naprijed i u obrnutom smjeru), dok su PCR produkti AA i GG genotipa sekvencirani samo u obrnutom smjeru jer reakciju prema naprijed nije bilo moguće očitati zbog smještaja polimorfnog mjesta blizu samog početka PCR produkta.

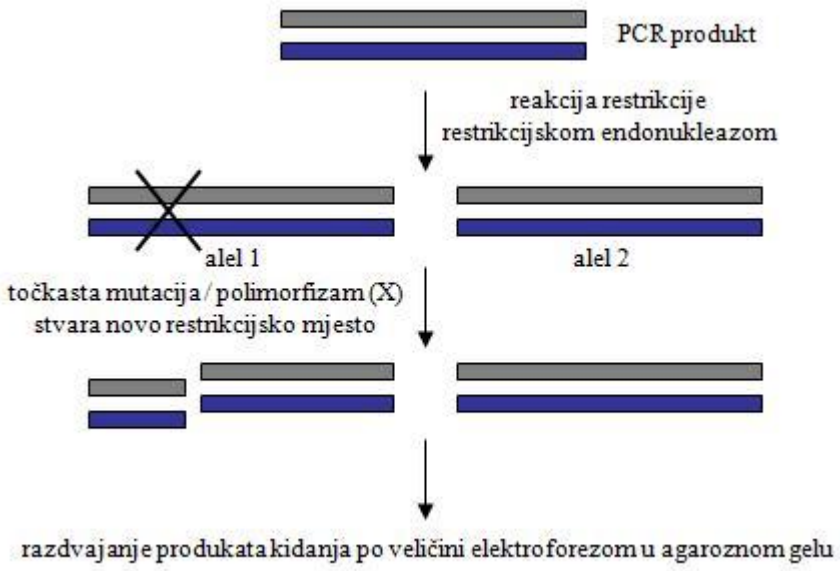
3.2.13. Elektroforeza umnoženih fragmenata DNA u agaroznom gelu

Uspješnost PCR reakcije provjerava se elektroforezom umnoženih produkata PCR reakcije u 1,5 %-tnom agaroznom gelu za -1562 C/T i Q279R polimorfizam, odnosno u 4 %-tnom agaroznom gelu za uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$. Elektroforetska pokretljivost fragmenata DNA ovisi o njihovoj veličini i obliku. Na učinkovitost razdvajanja utječu koncentracija agaroze, jakost i smjer električnog polja, sastav pufera za elektroforezu i prisutnost interkalirajućih boja (etidijev bromid).

1,5 %-tni agarozni gel pripremi se otapanjem 0,9 g agaroze u 60 mL TAE pufera za elektroforezu (0,04 mol/L Tris-HCl pH 7,9, 5 mmol/L natrijev acetat, 0,04 mmol/L EDTA) uz zagrijavanje, dok se 4 %-tni agarozni gel pripremi otapanjem 3,2 g agaroze u 80 mL TAE pufera za elektroforezu uz zagrijavanje. Nakon što se agaroza otopi i ohladi na otprilike 60˚C doda se 3 μL, odnosno 4 μL etidijevog bromida (konačne koncentracije 0,5 μg/mL). Otopina agaroze se izlije u kadicu za elektroforezu i ostavi da se polimerizira otprilike 45 minuta. Uzorci se prije nanošenja na gel razrijede u puferu za nanošenje uzoraka (40 % saharoza, 0,25 % bromfenolno plavilo u destiliranooj vodi) tako da se 5 μL PCR produkta pomiješa s 2 μL pufera za nanošenje uzoraka. Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata vrši se sustavom za elektroforezu SEA 2000 (Elchrom Scientific AG) uz sustav za hlađenje MultiTemp III (Amersham Biosciences). Elektroforeza se provodi u TAE puferu na 120 V tijekom 1 h uz temperaturu od 15˚C. Vizualizacija razdvojenih fragmenata vrši se pod UV svjetlom i fotografira Uvitec sustavom.

3.2.14. Polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP)

Za otkrivanje točkastih mutacija ili polimorfizama koji uključuju promjenu slijeda DNA u jednom nukleotidu (SNP, eng. *single nucleotide polymorphism*) korištena je metoda polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP, eng. *restriction fragment length polymorphism)*. Ta metoda temelji se na korištenju restrikcijske endonukleaze za kidanje umnoženog fragmenta DNA. Restrikcijske endonukleaze (ili restrikcijski enzimi) kidaju dvolančanu molekulu DNA na mjestu koje je određeno specifičnim nukleotidnim slijedom koji je najčešće kratki motiv dužine 4 - 6 pb. Osnovni preduvjet korištenja RFLP metode je da SNP dovodi do gubitka postojećeg ili nastanka novog restrikcijskog mjesta za korišteni enzim (slika 3.3.). Ovisno o tome koji nukleotid je prisutan u polimorfnom mjestu doći će do kidanja umnoženog fragmenta DNA ili će ono izostati.



Slika 3.3. Shematski prikaz metode polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (RFLP).

Nakon umnožavanja fragmenta DNA PCR metodom slijedilo je izlaganje produkata reakcije djelovanju restrikcijske endonukleaze. Polimorfno mjesto **-1562 C/T** detektirano je upotrebom **SphI** restrikcijske endonukleaze koja prepoznaje slijed

5'-GCATGˇC-3'

3'-CˆGTACG-5'

kada je u promotorskoj regiji *MMP9* gena na poziciji -1562 nukeotid C zamijenjen nukleotidom T, dok je polimorfno mjesto **Q279R** detektirano upotrebom **SmaI** restrikcijske endonukleaze koja prepoznaje slijed

5'-CCCˇGGG-3'

3'-GGGˆCCC-5'

kada je u egzonu 6 *MMP9* gena u tripletu CAG koji kodira za aminokiselinu Gln nukeotid A zamijenjen nukleotidom G, te dolazi do nastanka tripleta CGG i zamjene aminokiselinom Arg.

Reakcijska smjesa za restrikciju (ukupnog volumena 15 μL) pri detekciji polimorfnog mjesta **-1562 C/T** sadržavala je 10 μL PCR produkta, 1x pufer za restrikciju (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) (New England BioLabs) i 5 jedinica restrikcijskog enzima **SphI** (New England BioLabs).

Reakcijska smjesa za restrikciju (ukupnog volumena 15 μL) pri detekciji polimorfnog mjesta **Q279R** sadržavala je 10 μL PCR produkta, 1x pufer za restrikciju (50 mM kalijev acetat, 20 mM Tris-acetat pH 7,9, 10 mM magnezijev acetat, 1 mM DTT) (New England BioLabs) i 5 jedinica restrikcijskog enzima **SmaI** (New England BioLabs).

Reakcijske smjese inkubirane su preko noći na 37˚C za **-1562 C/T** polimorfizam, odnosno na 25˚C za **Q279R** polimorfizam. U tablici 3.3. navedene su veličine produkata nastale kidanjem PCR produkata restrikcijskim enzimima.

Tablica 3.3. Restrikcijski enzimi i veličine RFLP produkata.

polimorfizam	restrikcijski enzim	veličina RFLP produkata
-1562 C/T	**SphI**	C alel: 435 pb
		T alel: 188 i 247 pb
Q279R	**SmaI**	A alel: 194 pb
		G alel: 30 i 164 pb

3.2.15. Elektroforeza RFLP produkata u agaroznom gelu

Produkti kidanja fragmenata DNA nakon restrikcije razdvojeni su elektroforezom u 3 %-tnom agaroznom gelu za -1562 C/T polimorfizam, odnosno u 4 %-tnom agaroznom gelu za Q279R polimorfizam.

3 %-tni agarozni gel pripremi se otapanjem 1,8 g agaroze u 60 mL TAE pufera za elektroforezu uz zagrijavanje, dok se 4 %-tni agarozni gel pripremi otapanjem 3,2 g agaroze u 80 mL TAE pufera za elektroforezu uz zagrijavanje. Nakon što se agaroza otopi i ohladi na otprilike 60˚C doda se 3 μL, odnosno 4 μL etidijevog bromida (konačne koncentracije 0,5 μg/mL). Otopina agaroze se izlije u kadicu za elektroforezu i ostavi da se polimerizira otprilike 45 minuta. Uzorci se prije nanošenja na gel razrijede u puferu za nanošenje uzoraka tako da se 15 μL RFLP produkta pomiješa s 2 μL pufera za nanošenje uzoraka. Elektroforetsko razdvajanje RFLP produkata vrši se sustavom za elektroforezu SEA 2000 (Elchrom Scientific AG) uz sustav za hlađenje MultiTemp III (Amersham Biosciences). Elektroforeza se provodi u TAE puferu na 120 V tijekom 1 h za -1562 C/T polimorfizam, odnosno tijekom 1,5 h za Q279R polimorfizam, uz temperaturu od 15˚C. Vizualizacija razdvojenih fragmenata vrši se pod UV svjetlom i fotografira Uvitec sustavom.

3.2.16. Fragmentarna analiza na automatskom sekvenceru

Duljina fragmenata DNA koji sadrže uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ (u promotorskoj regiji *MMP9* gena) umnoženih PCR metodom odredi se fragmentarnom analizom na automatskom sekvenceru. Uz korištenje fluorescentno obilježenih početnica i analizom uzoraka na automatskom sekvenceru (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), ovom metodom je moguće, osim točne dužine, točno kvantificirati i jačinu signala svakog fragmenta.

Nakon PCR reakcije provedene uz upotrebu jedne od početnica obilježene fluorescentnom bojom FAM, po 1,5 µL svakog PCR produkta pomiješa se s 12 µl Hi-Di formamida (Applied Biosystems) i 0,35 µL standarda za duljinu fragmenata DNA (GeneScan 500 LIZ Size Standard; Applied Biosystems). Tako pripremljeni uzorci centrifugiraju se na 20000 g tijekom 2 minute te se denaturiraju na 95˚C tijekom 2 do 3 minute. Uzorci se zatim nanesu na automatizirani uređaj za kapilarnu elektroforezu (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) i nakon elektroforeze analiziraju programom GeneMapper Software, verzija 4.0 (Applied Biosystems).

Nakon fragmentarne analize na automatskom sekvenceru broj uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ u promotorskoj regiji *MMP9* gena utvrđen je računski. Prema nukleotidnom slijedu prikazanom na slici 3.4. izračunat je broj nukleotida koji se ne ponavljaju (56) te je broj uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ određen tako da je od duljine umnoženog fragmenta određene na sekvenceru oduzet broj 56, a dobiveni broj podijeljen s brojem 2.

AAGCCCTTTCTCATGCTGGTGCTGCCACACACACACACACACACACACACACA
CACACACACACACACACCCTGACCCCTGAGTCAGCACTTGCCTGTCAAGGAGGGG
TGGGGTCACAGGAGCGCCTCCTTAAAGCCCCCACAACAGCAGCTGCAGTCAGAC
ACCTCTGCCCTCACCATGAGCCTCTGGCAGCCCCTGGTCCTGGTGCTCCTGGTGCT

Slika 3.4. Nukleotidni slijed dijela promotorske regije *MMP9* gena (preuzeto s www.ncbi.nlm.nih.gov). Žutom bojom su označena mjesta vezanja početnica, sivom bojom uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$, a plavom bojom početak gena za MMP-9.

3.2.17. Određivanje katalitičke aktivnosti DPPIV u serumu

Aktivnost DPPIV u serumu svih ispitanika određena je metodom koju su opisali Nagatsu i suradnici (1976). Mjereno je odvajanje p-nitroanilina od substrata Gly-Pro p-nitroanilida (Sigma-Aldrich). Reakcija je rađena u 0,1 mol/L Tris-HCl puferu pH 8,0 koji je sadržavao 2 mmol/L Gly-Pro p-nitroanilida i 20 μL uzorka seruma u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 0,2 mL. Nakon 30 min inkubacije na 37˚C, reakcija je zaustavljena dodatkom 0,8 mL 1 mol/L natrijevog acetata pH 4,5 te je izmjerena apsorbancija na 405 nm prema slijepoj probi uzorka koristeći Cary UV/VIS spektrofotometar (Varian). Sve reakcije izvedene su u duplikatu.

3.2.18. Statistička obrada podataka dobivenih u uzorcima ispitanika

Rezultati su analizirani upotrebom programa SigmaStat za Windows-e, verzija 3.00 (SPSS Inc.) ili MedCalc za Windows-e, verzija 12.3.0 (MedCalc Software). Kvalitativne varijable prikazane su kao apsolutni brojevi ili postoci, a međusobno su uspoređene χ^2 *testom* ili *Fisherovim egzaktnim testom*. Normalnost raspodjele podataka testirana je *Kolmogorov-Smirnovim testom*. Podaci koji nisu bili normalno raspodijeljeni prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila). Podaci dobiveni na izoliranim polimorfonuklearnim leukocitima su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Statističke razlike između skupina koje su pokazale normalnu raspodjelu testirane su parametrijskim testovima za usporedbu dvije skupine podataka (*t-test*) ili za usporedbu više od dvije skupine podataka (jednosmjerna analiza varijance, eng. *One Way Analysis of Variance*, ANOVA), dok su kod skupina koje nisu pokazale normalnu raspodjelu statističke razlike testirane neparametrijskim testovima za usporedbu dvije skupine podataka (*Mann-Whitney Rank Sum Test*) ili za usporedbu više od dvije skupine podataka (*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*). *Post hoc* analize provedene su *Dunettovim testom značajnosti*. Korelacije su ispitane upotrebom *Spearmanovog koeficijenta korelacije*. Dijagnostička točnost ispitana je analizom ROC (eng. *receiver operating characteristic*) krivulja i određivanjem površine ispod ROC krivulje (eng. *area under the ROC curve*, AUC). Prediktivne varijable uključene su u *multivarijatnu logističku regresijsku analizu* ako je za njih *univarijatnom logističkom regresijskom analizom* dobiven $P<0,05$. Za statistički značajne razlike uzeta je vrijednost $P<0,05$.

4. REZULTATI

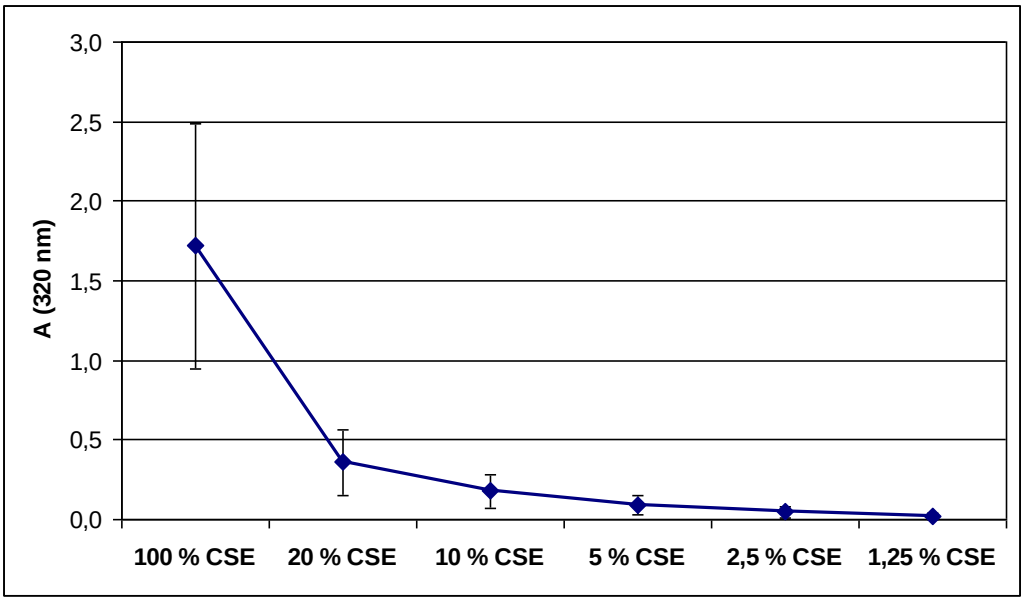
4.1. ISPITIVANJE UTJECAJA DIMA CIGARETA NA ALVEOLARNE EPITELNE STANICE A549

4.1.1. Standardizacija ekstrakta dima cigareta

Ekstrakt dima cigareta (eng. *Cigarette Smoke Extract*, CSE) pripreman je neposredno prije svakog pokusa. Kako bi provjerili da je svaki pojedini ekstrakt pripremljen na isti način, napravljena je standardizacija mjerenjem apsorbancija niza ekstrakata različitih koncentracija na 320 nm, kao što je prikazano u tablici 4.1. i na slici 4.1.

Tablica 4.1. Apsorbancija (srednja vrijednost ± 2 standardne devijacije) ekstrakata dima cigareta (CSE) različitih koncentracija izmjerena na 320 nm.

	A (320 nm)
100 % CSE	1,717 ± 0,772
20 % CSE	0,361 ± 0,206
10 % CSE	0,180 ± 0,107
5 % CSE	0,091 ± 0,059
2,5 % CSE	0,048 ± 0,034
1,25 % CSE	0,024 ± 0,021



Slika 4.1. Grafički prikaz apsorbancija ekstrakata dima cigareta (CSE) različitih koncentracija izmjerenih na 320 nm. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± 2 standardne devijacije od 6 neovisnih eksperimenata.

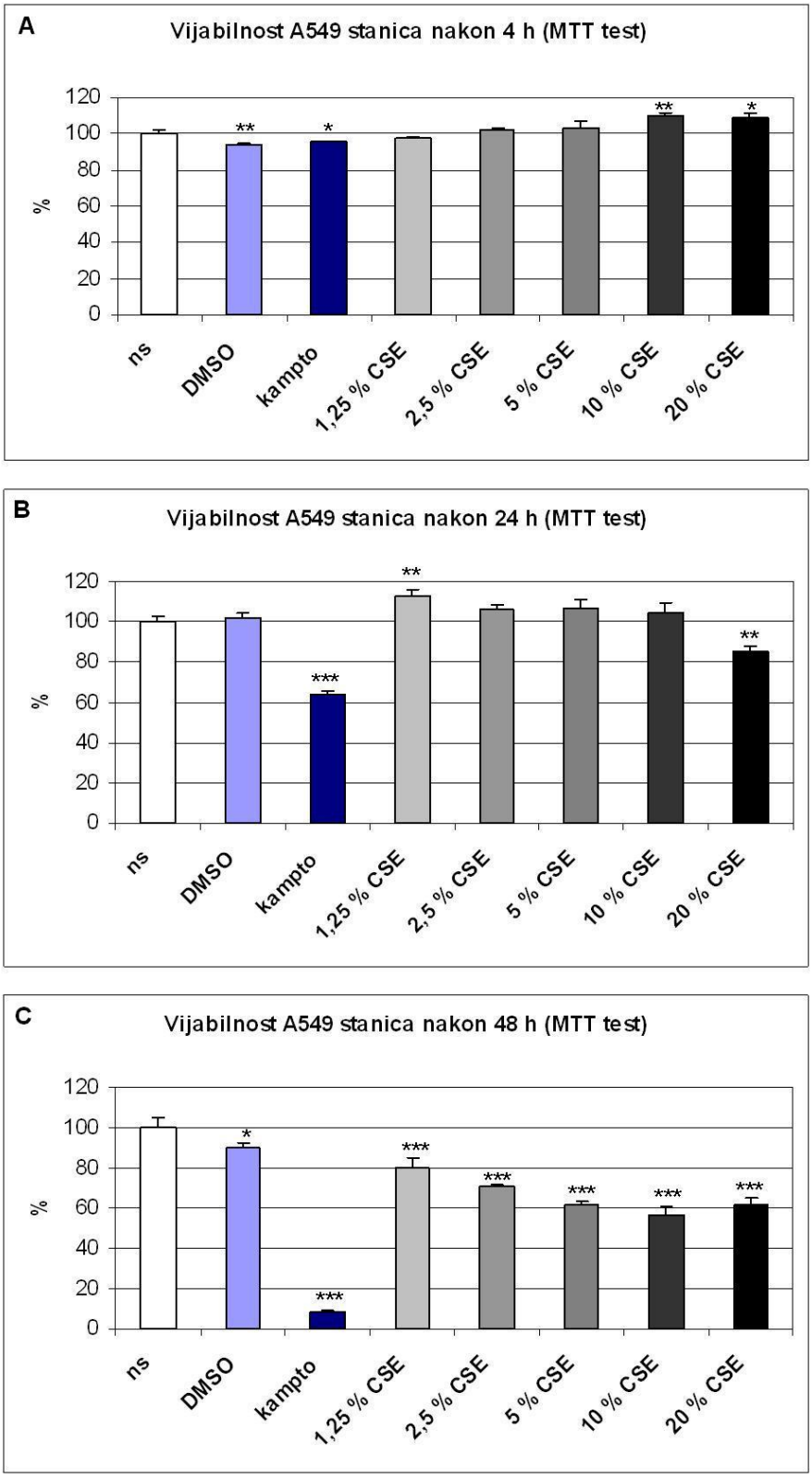
Prilikom pripreme ekstrakta dima cigareta za svaki pojedini pokus, najprije je provjereno odgovara li njegova apsorbancija na 320 nm ovim standardnim vrijednostima, a potom je taj ekstrakt korišten za tretiranje stanične linije ljudskih alveolarnih epitelnih stanica A549.

4.1.2. Citotoksičnost ekstrakta dima cigareta prema A549 stanicama

Citotoksičnost djelovanja ekstrakta dima cigareta na alveolarnim epitelnim stanicama A549 ispitana je mjerenjem vijabilnosti stanica MTT testom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u mediju iznad stanica te određivanjem načina umiranja stanica protočnom citometrijom.

4.1.2.1. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na vijabilnost A549 stanica (MTT test)

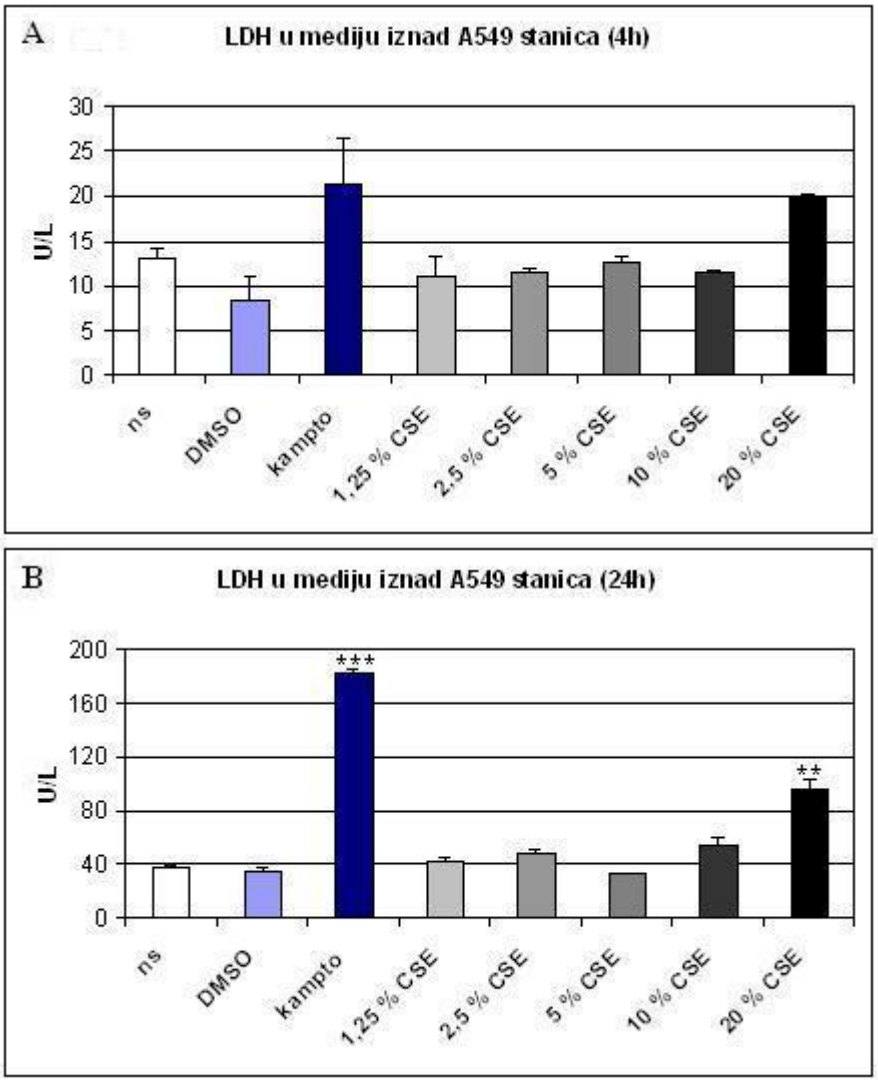
Vijabilnost A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta procijenjena je MTT testom (ispitivanjem redukcijskog potencijala stanica). Stanice su tretirane svježe pripremljenim ekstraktom dima cigareta u različitim koncentracijama (1,25 %, 2,5 %, 5 %, 10 % ili 20 %) tijekom 4 h, 24 h ili 48 h. Kao pozitivna kontrola za smanjenu vijabilnost, stanice su tretirane s 20 μM kamptotecinom otopljenim u DMSO tako da je konačna koncentracija DMSO u mediju iznosila 0,1 %. Kao što je prikazano na slici 4.2. A rezultati MTT testa pokazuju da ekstrakt dima cigareta u koncentracijama od 10 % i 20 % nakon 4-satne inkubacije dovodi do blagog povećanja vijabilnosti A549 stanica ($P<0,01$ i $P<0,05$) u odnosu na nestimulirane stanice. Iste koncentracije dima (10 % i 20 %) također uzrokuju povećanje vijabilnosti A549 stanica u odnosu na stanice izložene ektraktu dima cigareta u koncentraciji od 1,25 % ($P<0,001$ i $P<0,01$) i 2,5 % ($P<0,05$ i $P<0,05$). Nakon 24-satne inkubacije (slika 4.2. B) pri koncentraciji dima od 1,25 % također je prisutno blago povećanje vijabilnosti A549 stanica u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,01$), dok koncentracija dima od 20 % uzrokuje značajno smanjenje vijabilnosti A549 stanica u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,01$), ali i u odnosu na sve ostale koncentracije dima ($P<0,001$). Međutim, nakon 48-satne inkubacije A549 stanica s ekstraktom dima cigareta (slika 4.2. C), sve koncentracije dima cigareta dovode do značajnog smanjenja vijabilnosti A549 stanica u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,001$), dok koncentracije dima od 5 %, 10 % i 20 % vode i do smanjenja vijabilnosti stanica u odnosu na stanice izložene ektraktu dima cigareta u koncentraciji od 1,25 % ($P=0,001$, $P<0,001$ i $P<0,01$).



Slika 4.2. Grafički prikaz vijabilnosti A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A), 24 h (B) i 48 h (C) ispitane MTT testom. Skraćenice: ns = nestimulirane stanice; DMSO = 0,1 % dimetil-sulfoksid; kampto = 20 μM kamptotecin. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška jednog od tri neovisna eksperimenta (n = 6). Značajno različita vijabilnost u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * P<0,05, ** P<0,01 i *** P<0,001.

4.1.2.2. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje LDH u medij iznad A459 stanica

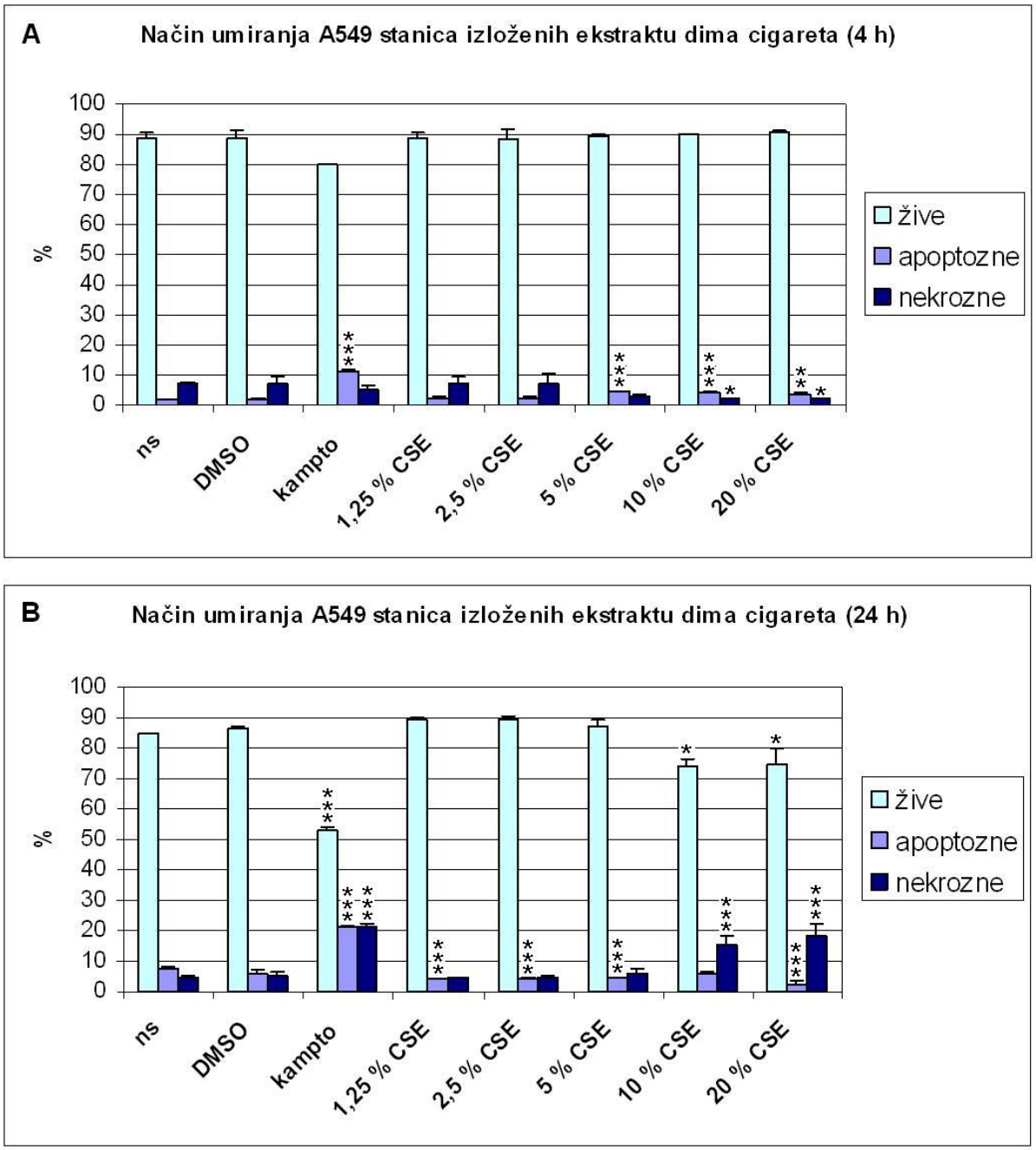
Integritet stanične membrane određuje se mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad stanica. Stanice A549 tretirane su svježe pripremljenim ekstraktom dima cigareta u različitim koncentracijama (1,25 %, 2,5 %, 5 %, 10 % ili 20 %) tijekom 4 h ili 24 h. Kao pozitivna kontrola, stanice su tretirane s 30 μM kamptotecinom otopljenim u DMSO tako da je konačna koncentracija DMSO u mediju iznosila 0,1 %. Iz slike 4.3. A vidljivo je da nakon 4-satne inkubacije stanica s ekstraktom dima cigareta nema značajnijeg otpuštanja LDH u medij u odnosu na nestimulirane stanice ($P=0,077$), a nije bilo niti razlika u opuštanju LDH između stanica izloženih različitim koncentracijama ekstrakta dima cigareta ($P=0,078$). S druge strane, nakon 24-satne inkubacije (slika 4.3. B) najveća koncentracija dima od 20 % dovodi do značajnog otpuštanja LDH u medij iznad A549 stanica u odnosu na nestimulirane stanice ($P=0,01$), što ukazuje na povećano umiranje stanica. Štoviše, ekstrakt dima cigareta u koncentraciji od 20 % uzrokovao je veće otpuštanje LDH iz stanica u odnosu i na sve ostale koncentracije dima ($P<0,001$), dok je 10 % ekstrakt dima cigareta izazvao veće otpuštanje LDH u odnosu na koncentraciju dima od 5 % ($P<0,01$).



Slika 4.3. Grafički prikaz katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenice: ns = nestimulirane stanice; DMSO = 0,1 % dimetil-sulfoksid; kampto = 30 μM kamptotecin. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška jednog od tri neovisna eksperimenta (n = 3). Značajno različita katalitička aktivnost LDH u mediju u odnosu na nestimulirane stanice označena je s ** P=0,01 i *** P<0,001.

4.1.2.3. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na način umiranja A549 stanica

Načina umiranja A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta određen je bojanjem stanica aneksinom V obilježenom fluorescentnom bojom i propidijevim jodidom te analizom na protočnom citometru, što omogućava razlikovanje stanica u ranoj apoptozi i nekroznih stanica od živih stanica. Stanice A549 tretirane su svježe pripremljenim ekstraktom dima cigareta u različitim koncentracijama (1,25 %, 2,5 %, 5 %, 10 % ili 20 %) tijekom 4 h ili 24 h. Kao pozitivna kontrola, stanice su tretirane s 20 μM kamptotecinom otopljenim u DMSO tako da je konačna koncentracija DMSO u mediju iznosila 0,1 %. Rezultati analize nakon 4-satne inkubacije pokazuju da koncentracije dima od 5 %, 10 % i 20 % dovode do značajnog povećanja broja stanica u ranoj apoptozi u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,001$ za 5 % i 10 % te $P<0,01$ za 20 %). Osim toga, koncentracije dima od 10 % i 20 % dovode i do značajnog smanjenja broja nekroznih stanica ($P<0,05$), dok razlika između stanica izloženih različitim koncentracijama ekstrakta dima cigareta nije bilo ($P>0,05$) (slika 4.4. A). Nakon 24-satne inkubacije značajno je smanjenje broja živih stanica pri tretmanu s 10 % i 20 % ekstraktom dima cigareta u odnosu na nestimulirane stanice, ali i u odnosu na stanice izložene ekstraktu dima cigareta u koncentracijama od 1,25 %, 2,5 % i 5 % ($P<0,05$). Također dolazi do značajnog smanjenja broja stanica u ranoj apoptozi pri koncentracijama dima cigareta od 1,25 %, 2,5 %, 5 % i 20 % u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,001$), dok razlika između stanica izloženih različitim koncentracijama ekstrakta dima cigareta nije bilo ($P>0,05$). Međutim, najveće koncentracije dima od 10 % i 20 % dovode do značajnog povećanja broja nekroznih stanica u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,001$), dok razlika između stanica izloženih različitim koncentracijama ekstrakta dima cigareta ni ovdje nije bilo ($P>0,05$) (slika 4.4. B).

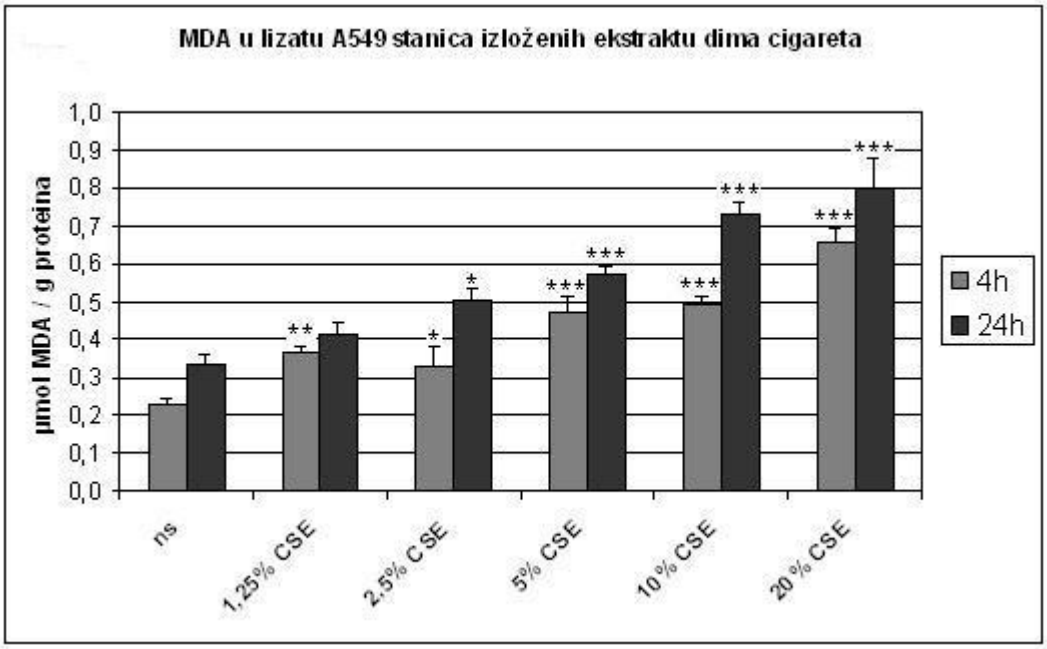


Slika 4.4. Grafički prikaz načina umiranja A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenice: ns = nestimulirane stanice; DMSO = 0,1 % dimetil-sulfoksid; kampto = 20 μM kamptotecin. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška jednog od dva neovisna eksperimenta (n = 3). Značajno različit broj stanica u odnosu na nestimulirane stanice označen je s * P<0,05, ** P<0,01 i *** P<0,001.

4.1.3. Razvoj oksidacijskog stresa u A549 stanicama izloženim ekstraktu dima cigareta

4.1.3.1. Ekstrakt dima cigareta povećava koncentraciju malondialdehida u A549 stanicama

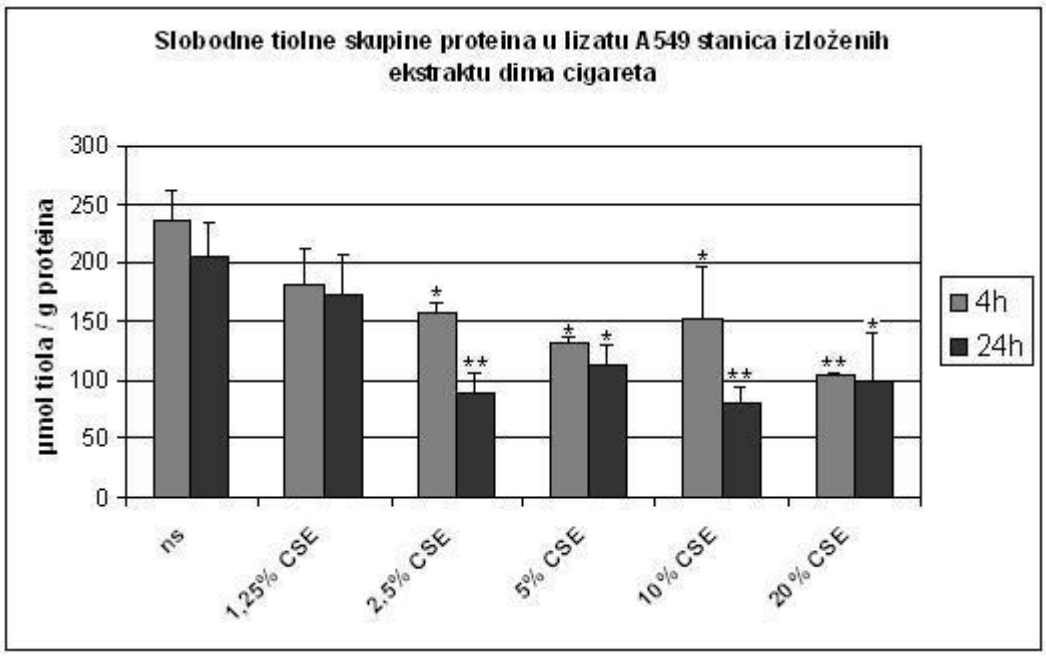
Malondialdehid (MDA) je produkt razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina iz staničnih membrana podložnih oštećenjima koja uzrokuju reaktivni kisikovi spojevi. Budući da dim cigareta sadrži brojne reaktivne kisikove spojeve, ispitan je njegov utjecaj na A549 stanice. Izlaganjem A549 stanica ekstraktu dima cigareta svih ispitanih koncentracija (1,25 %, 2,5 %, 5 %, 10 % ili 20 %) tijekom 4 h statistički se značajno povećava koncentracija MDA u odnosu na nestimulirane stanice (slika 4.5.). Štoviše, nakon 4 h koncentracija dima od 20 % povećava koncentraciju MDA i u odnosu na stanice izložene ekstraktu dima cigareta svih ostalih koncentracija ($P<0,01$), dok koncentracije dima od 5 % i 10 % povećavaju koncentraciju MDA u odnosu na stanice izložene dimu koncentracije 1,25 % i 2,5 % ($P<0,05$). Nakon 24-satne inkubacije ekstrakt dima cigareta u koncentracijama od 2,5 %, 5 %, 10 % i 20 % statistički značajno povećava koncentraciju MDA u odnosu na nestimulirane stanice (slika 4.5.). U istom vremenu koncentracije dima od 10 % i 20 % povećavaju koncentraciju MDA i u odnosu na stanice izložene dimu koncentracija 1,25 %, 2,5 % i 5 % ($P<0,05$). Iako je koncentracija MDA za svaku ispitanu koncentraciju dima bila veća nakon 24 h nego nakon 4 h inkubacije, statističkom usporedbom nismo potvrdili značajne razlike. Ovi rezultati ukazuju na lipidnu peroksidaciju u stanicama pod utjecajem dima cigareta.



Slika 4.5. Grafički prikaz koncentracije MDA u lizatu A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h i 24 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3). Značajno različita koncentracija MDA u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * P<0,05, ** P<0,01 i *** P<0,001.

4.1.3.2. Ekstrakt dima cigareta smanjuje koncentraciju slobodnih tiolnih skupina proteina u A549 stanicama

Slobodne tiolne skupine proteina u stanici potječu od cisteinskih aminokiselinskih ostataka i podložne su oksidacijskim promjenama. Kako bi ispitali utjecaj ekstrakta dima cigareta na koncentraciju slobodnih tiolnih skupina proteina, stanice su izložene ekstraktu dima cigareta različitih koncentracija (1,25 %, 2,5 %, 5 %, 10 % ili 20 %) tijekom 4 h i 24 h (slika 4.6.). Rezultati pokazuju statistički značajno sniženje koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina u A549 stanicama izloženim djelovanju ekstrakta dima cigareta koncentracija 2,5 %, 5 %, 10 % i 20 % u odnosu na nestimulirane stanice tijekom oba ispitana vremena. Štoviše, nakon 4 h koncentracija dima od 20 % snizuje koncentraciju slobodnih tiolnih skupina proteina i u odnosu na stanice izložene ekstraktu dima cigareta koncentracije 1,25 % ($P<0,05$), dok nakon 24-satne inkubacije isto uzrokuju koncentracije dima od 2,5 % i 10 % u odnosu na stanice izložene dimu koncentracije 1,25 % ($P<0,05$). Međutim, usporedbom različitih vremena inkubacije (4 h i 24 h) nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji slobodnih tiolnih skupina proteina. Ovi rezultati ukazuju na oksidacijska oštećenja proteina u stanicama pod utjecajem dima cigareta.

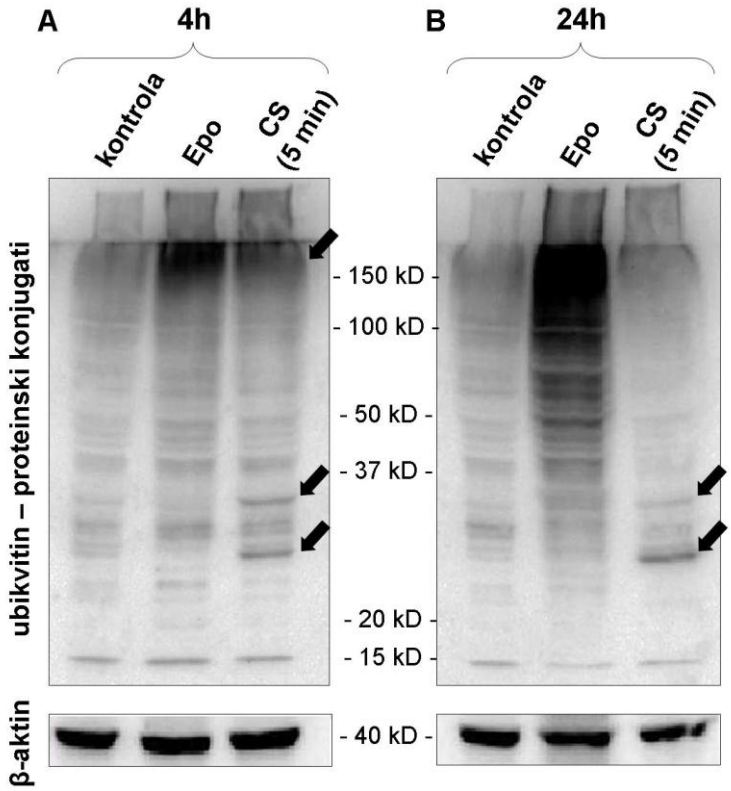


Slika 4.6. Grafički prikaz koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina u lizatu A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h i 24 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3). Značajno različita koncentracija slobodnih tiolnih skupina u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * $P<0,05$ i ** $P<0,01$.

4.1.4. Utjecaj dima cigareta na razgradnju oštećenih proteina u A549 stanicama

4.1.4.1. Dim cigareta uzrokuje nakupljanje ubikvitin-proteinskih konjugata u A549 stanicama

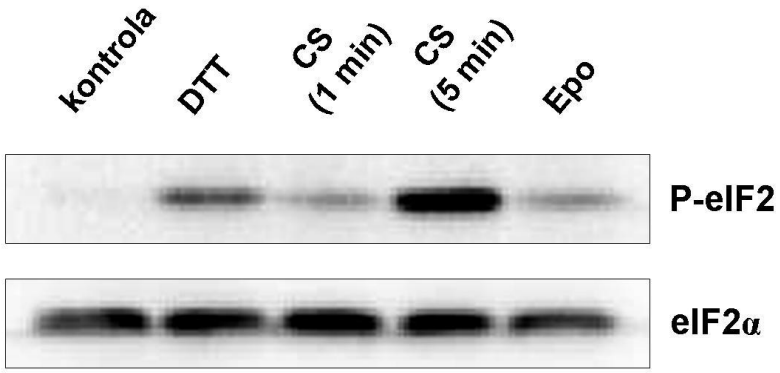
U prethodnom smo pokusu ustanovili da dim cigareta oštećuje stanične proteine. Oštećeni proteini koji se ne mogu popraviti obilježavaju se kovalentnim vezanjem molekula ubikvitina kako bi se razgradili putem proteasoma. Slika 4.7. prikazuje nakupljanje ubikvitin-proteinskih konjugata u lizatima A549 stanica izloženih dimu cigareta tijekom 5 minuta te kultiviranih sljedećih 4 h ili 24 h. Nakon 4 h (slika 4.7. A) pod utjecajem dima cigareta javljaju se intenzivne vrpce ubikvitin-proteinskih konjugata molekulske mase oko 30 i 35 kD kao i onih iznad 150 kD. Nakon 24 h (slika 4.7. B) ubikvitin-proteinski konjugati iznad 150 kD su slabijeg intenziteta, ali konjugati molekulske mase oko 30 i 35 kD ostaju jasno vidljivi. Izlaganje stanica 1 μM epoksomicinu (inhibitoru aktivnosti proteasoma) rezultiralo je nakupljanjem ubikvitin-proteinskih konjugata većih molekulskih masa nakon 4 h i 24 h, kao što je i očekivano. Međutim, ubikvitin-proteinski konjugati mase oko 30 i 35 kDa nisu vidljivi u lizatima stanica tretiranih s epoksomicinom, ukazujući da oni nastaju samo pod djelovanjem dima cigareta (Somborac Bačura i sur., 2013).



Slika 4.7. Western blot analiza ubikvitin-proteinskih konjugata u lizatima A549 stanica izloženih dimu cigareta (CS) tijekom 5 minuta te inkubiranih idućih 4 h (A) ili 24 h (B). Kao negativna kontrola, stanice su izložene zraku tijekom 5 minuta (umjesto dimu cigareta). Stanice izložene 1 μM epoksomicinu (Epo) služile su kao pozitivna kontrola. Strelice ukazuju na proteinske vrpce jačeg intenziteta. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta (prema Somborac Bačura i sur., 2013).

4.1.4.2. Razvoj ER stresa pod utjecajem dima cigareta u A549 stanicama

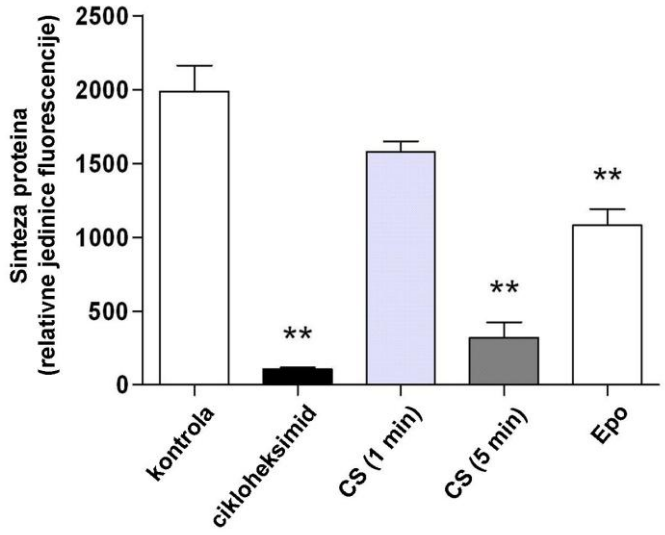
Pretpostavili smo da oštećenje proteina, kao što je prikazano na slici 4.7. u obliku ubikvitin-proteinskih konjugata, dovodi do njihovog nakupljanja u ER-u i izaziva ER stres, te posljedično UPR. Jedan od biljega ER stresnog odgovora je aktivirani eIF2α. Ovaj ogranak UPR-a je izravno uključen u sintezu proteina, što je važno za normalnu homeostazu proteina u stanici. Aktivacija eIF2α odvija se fosforiliracijom na poziciji Ser51, što ima za posljedicu privremenu obustavu sinteze proteina u stanici (Hengstermann i Müller, 2008). Na slici 4.8. prikazano je kako izlaganje A549 epitelnih stanica dimu cigareta i kultiviranje idućih 0,5 h dovodi do povećanja razine fosforiliranog eIF2α (P-eIF2α) u odnosu na negativnu kontrolu ovisno o dozi dima. Ditiotreitol, za kojeg je poznato da uzrokuje ER stres, je korišten kao pozitivna kontrola. Nešto duža inkubacija (4 h) je bila potrebna da proteasomalni inhibitor epoksomicin izazove porast razine P-eIF2α, što je dokaz da akumulacija ubikvitin-proteinskih konjugata dovodi do ER stresa. Rezultati pokazuju da izlaganjem A549 stanica dimu cigareta dolazi do aktivacije eIF2α, ogranka UPR-a koji vjerojatno vodi do smanjenja sinteze proteina u stanicama (Somborac Bačura i sur., 2013).



Slika 4.8. Western blot analiza aktivacije eIF2α (P-eIF2α) u lizatima A549 stanica izloženih dimu cigareta (CS) tijekom 1 ili 5 minuta te inkubiranih idućih 0,5 h, ili 1 μM epoksomicinu (Epo) te inkubiranih idućih 4 h. Kao negativna kontrola, stanice su izložene zraku tijekom 5 minuta (umjesto dimu cigareta). Stanice izložene 2 mM ditiotreitolu (DTT) služile su kao pozitivna kontrola. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta (prema Somborac Bačura i sur., 2013).

4.1.4.3. Dim cigareta smanjuje *de novo* sintezu proteina u A549 stanicama

Siteza proteina izmjerena je u stanicama izloženim dimu cigareta ili epoksomicinu (slika 4.9.), za koje smo prethodno pokazali da induciraju ER stresni odgovor (slika 4.8.). Kao pozitivna kontrola, stanice su izložene cikloheksimidu, inhibitoru sinteze proteina.

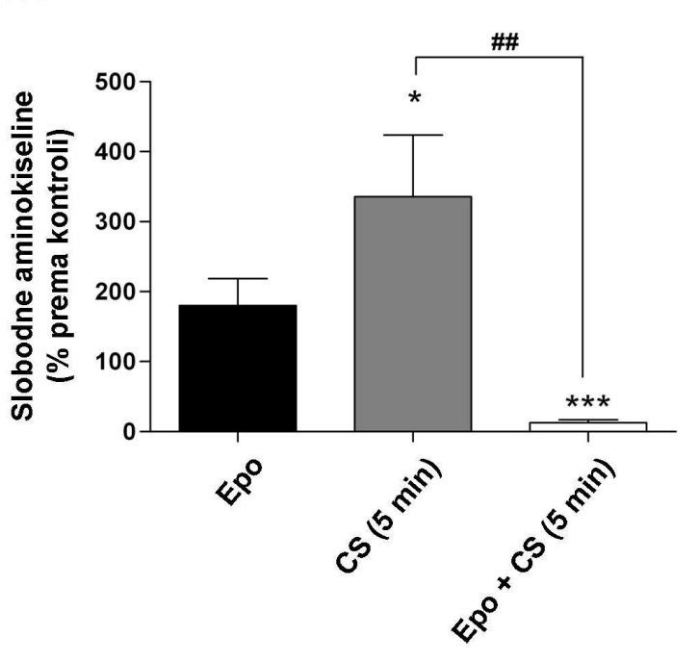


Slika 4.9. Grafički prikaz *de novo* sinteze proteina u A549 stanicama izloženim djelovanju dima cigareta (CS) tijekom 1 ili 5 minuta ili 1 μM epoksomicinu (Epo) te inkubiranih idućih 4 h. Kao negativna kontrola, stanice su izložene zraku tijekom 5 minuta (umjesto dimu cigareta). Stanice izložene 10 μM cikloheksimidu služile su kao pozitivna kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 4). Značajno različita sinteza proteina u odnosu na negativnu kontrolu označena je s ** $P<0,01$ (prema Somborac Bačura i sur., 2013).

Analiza je pokazala da je *de novo* sinteza proteina u A549 epitelnim stanicama smanjena 4 h nakon izlaganja dimu cigareta tijekom 1 minute (bez statistički značajne razlike) ili tijekom 5 minuta ($P<0,01$) u odnosu na negativnu kontrolu. Prema tome, dim cigareta snažno inhibira sintezu proteina, što bi se moglo objasniti kao pokušaj stanice da ponovno uspostavi homeostazu proteina prije nego li započne sa sintezom novih proteina. Epoksomicin je također uzrokovao smanjenu sintezu proteina u odnosu na negativnu kontrolu ($P<0,01$), ukazujući da inhibicija proteasoma vodi do nakupljanja oštećenih proteina u ER-u, koji se ne mogu razgraditi putem proteasoma, nego ometaju normalnu funkciju ER-a i induciraju UPR. U skladu s jačom aktivacijom eIF2α (slika 4.8.), dim cigareta je pokazao i jači učinak na smanjenje sinteze proteina nego epoksomicin (Somborac Bačura i sur., 2013).

4.1.4.4. Dim cigareta povećava koncentraciju slobodnih aminokiselina u A549 stanicama

Istraživanje koje su proveli Abello i suradnici (2008) pokazalo je da dim cigareta povećava koncentraciju slobodnih aminokiselina u A549 stanicama, pa nas je zanimalo može li se to povezati s aktivnošću proteasoma. Izložili smo A549 stanice zraku (negativna kontrola), epoksomicinu (inhibitor aktivnosti proteasoma; pozitivna kontrola), dimu cigareta ili kombinaciji epoksomicina i dima cigareta te ih kultivirali tijekom idućih 4 h. U lizatima stanica izloženih dimu cigareta značajno je porasla razina slobodnih aminokiselina u usporedbi s kontrolnim stanicama ($P<0,05$) (slika 4.10.). Međutim, kada je aktivnost proteasoma u stanicama izloženim dimu cigareta blokirana epoksomicinom, došlo je do značajnog pada razine slobodnih aminokiselina u usporedbi sa stanicama izloženim samo dimu cigareta ($P<0,01$). Sami epoksomicin nije doveo do značajne promjene u koncentraciji slobodnih aminokiselina. Ovi rezultati pokazuju da je porast aminokiselina u stanicama izloženim dimu cigareta uzrokovan povećanom razgradnjom oštećenih proteina putem proteasoma (Somborac Bačura i sur., 2013).



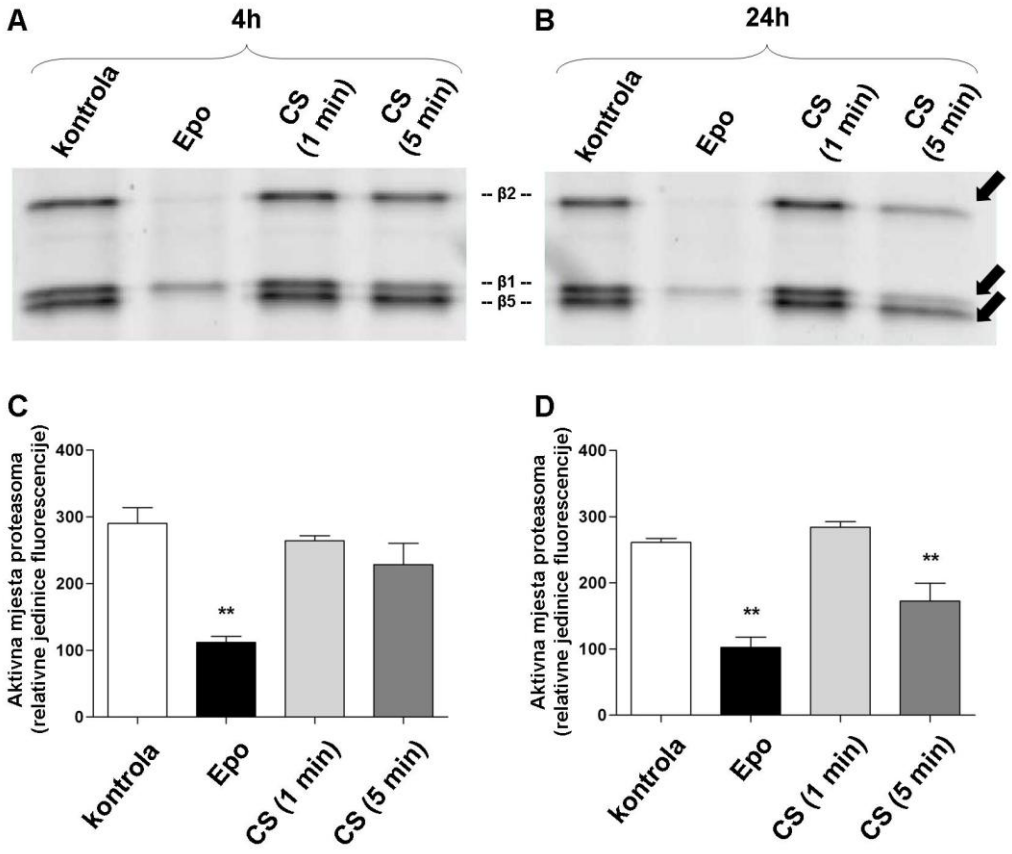
Slika 4.10. Grafički prikaz koncentracije slobodnih aminokiselina u A549 stanicama izloženim djelovanju 1 μM epoksomicina (Epo), dima cigareta (CS) tijekom 5 minuta ili kombinaciji epoksomicina i dima cigareta te inkubiranih idućih 4 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3), a izraženi su prema negativnoj kontroli (stanicama izloženim zraku tijekom 5 minuta, umjesto dimu cigareta) označenoj kao 100 %. Značajno različita razina slobodnih aminokiselina u odnosu na negativnu kontrolu označena je s * $P<0,05$ i *** $P<0,001$. Značajno različita razina slobodnih aminokiselina u odnosu na stanice izložene dimu cigareta označena je s ## $P<0,01$ (prema Somborac Bačura i sur., 2013).

4.1.4.5. Dim cigareta smanjuje aktivnost proteasoma u A549 stanicama

S obzirom da su proteasomi glavna mjesta razgradnje oštećenih proteina u stanici obilježenih molekulama ubikvitina, ispitali smo utječe li dim cigareta na aktivnost proteasoma u A549 epitelnim stanicama.

4.1.4.5.1. Utjecaj dima cigareta na aktivna mjesta proteasoma u A549 stanicama

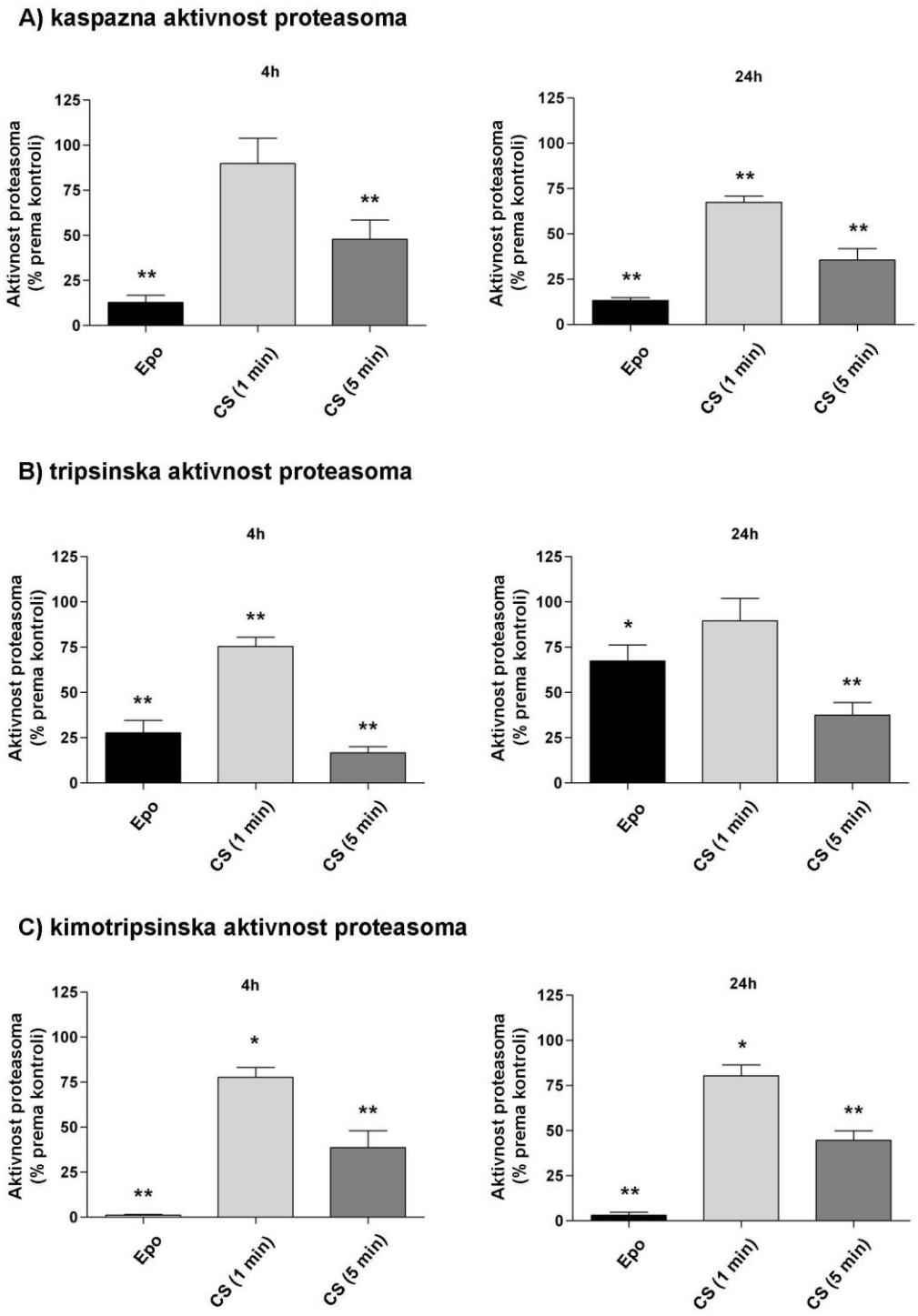
Da bismo ispitali utječe li dim cigareta na aktivna mjesta proteasoma u A549 epitelnim stanicama, izložili smo stanice dimu cigareta tijekom 1 ili 5 minuta i kultivirali ih sljedećih 4 h ili 24 h. Sva tri aktivna mjesta proteasoma (β1 - kaspazno, β2 - tripsinsko i β5 - kimotripsinsko) detektirana su inhibitorom proteasoma MV151 obilježenim fluorescentnom bojom. Dim cigareta nije značajno utjecao na aktivna mjesta proteasoma u stanicama kultiviranim 4 h (slika 4.11. A i C). Međutim, u stanicama izloženim dimu cigareta tijekom 5 minuta i kultiviranim idućih 24 h dim cigareta je uzrokovao smanjeno vezanje MV151 na aktivna mjesta proteasoma u odnosu na negativnu kontrolu ($P<0,01$), dok istog učinka nije bilo nakon izlaganja dimu cigareta tijekom 1 minute (slika 4.11. B i D). To pokazuje da vrijeme izlaganja dimu cigareta utječe na ukupnu akivnost proteasoma. Kao pozitivna kontrola i u ovom ekperimentu je korišten epoksomicin koji je učinkovito blokirao vezanje fluorescentno obilježenog MV151 na aktivna mjesta proteasoma.



Slika 4.11. Aktivna mjesta proteasoma (β1 - kaspazno, β2 - tripsinsko i β5 - kimotripsinsko) u A549 stanicama izloženim dimu cigareta (CS) tijekom 1 ili 5 minuta te inkubiranih idućih 4 h (A i C) ili 24 h (B i D). Kao negativna kontrola, stanice su izložene zraku tijekom 5 minuta (umjesto dimu cigareta). Stanice izložene 1 μM epoksomicinu (Epo) služile su kao pozitivna kontrola. Strelice (pod B) ukazuju na aktivna mjesta proteasoma slabijeg intenziteta pod utjecajem dima cigareta. Rezultati (pod C i D) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz tri neovisna eksperimenta. Značajne razlike u aktivnim mjestima proteasoma u odnosu na negativnu kontrolu označene su s ** $P<0,01$.

4.1.4.5.2. Utjecaj dima cigareta na aktivnost proteasoma u A549 stanicama

Da bismo ispitali učinak dima cigareta na pojedine aktivnosti proteasoma, što smo prethodno pokazali smanjenim vezanjem inhibitora obilježenim fluorescentnom bojom, izložili smo A549 stanice dimu cigareta tijekom 1 ili 5 minuta te nakon 4 h i 24 h mjerili sve tri aktivnosti proteasoma: kaspaznu, tripsinsku i kimotripsinsku aktivnost, koristeći pri tom supstrate specifične za svako aktivno mjesto. Epoksomicin je i ovdje korišten kao pozitivna kontrola. Kaspazna, tripsinska i kimotripsinska proteasomalna aktivnost su bile značajno smanjene u stanicama izloženim dimu nakon 4 h kao i nakon 24 h u odnosu na negativnu kontrolu (slika 4.12. A, B i C), što nam govori da dim cigareta smanjuje aktivnost proteasoma ovisno i o dozi dima i o vremenu (Somborac Bačura i sur., 2013).

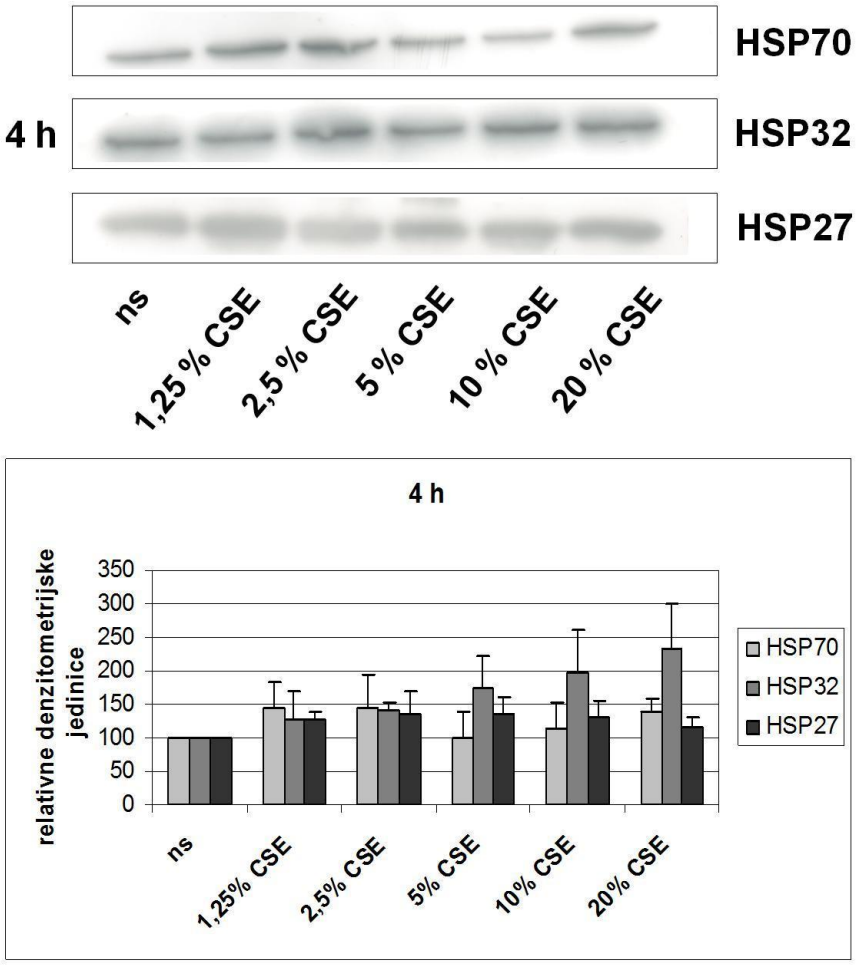


Slika 4.12. Proteasomalne aktivnosti (A - kaspazna, B - tripsinska i C - kimotripsinska) u A549 stanicama izloženim dimu cigareta (CS) tijekom 1 ili 5 minuta te inkubiranih idućih 4 h ili 24 h. Stanice izložene 1 μM epoksomicinu (Epo) služile su kao pozitivna kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 4), a izraženi su prema negativnoj kontroli (stanicama izloženim zraku tijekom 5 minuta, umjesto dimu cigareta) označenoj kao 100 %. Značajno različite aktivnosti proteasoma u odnosu na negativnu kontrolu označene su s * $P<0,05$ i ** $P<0,01$ (prema Somborac Bačura i sur., 2013).

4.1.5. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na ekspresiju HSP u A549 stanicama

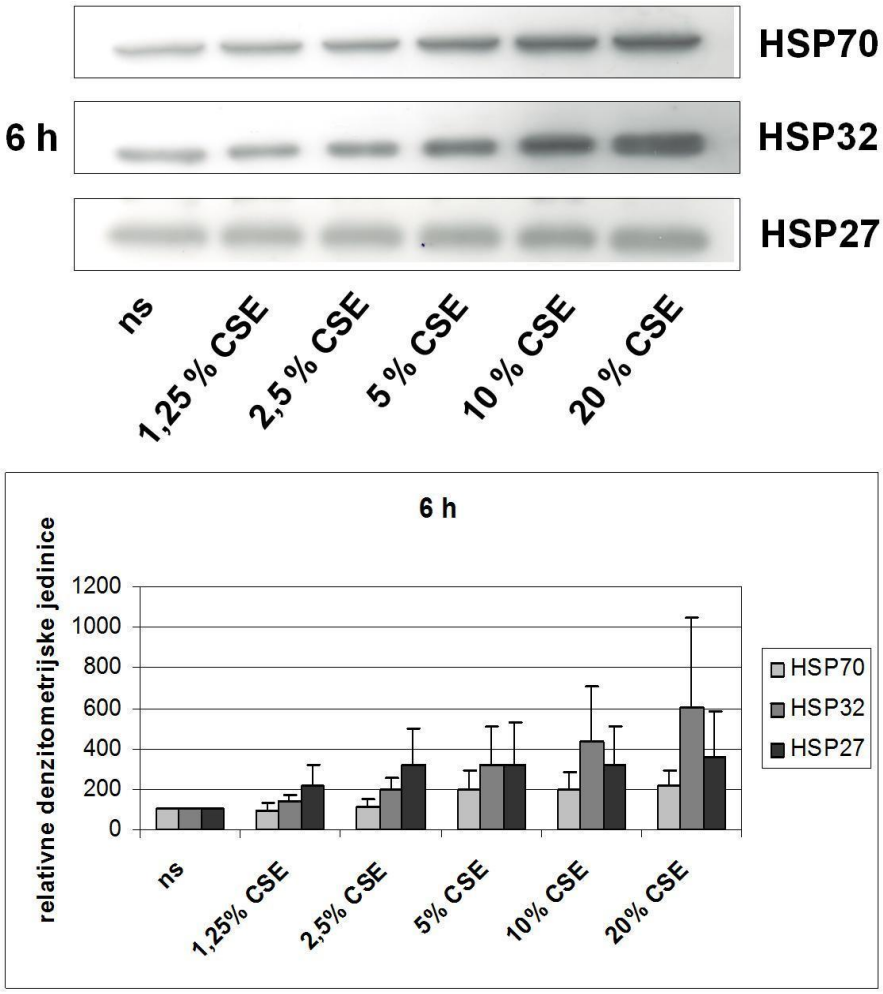
U različitim stresnim uvjetima u kojima dolazi do oštećenja staničnih proteina povećava se sinteza HSP kako bi se povećala mogućnost preživljavanja stanica (Srivastava, 2008). Stoga smo Western blot metodom ispitali promjene u ekspresiji HSP70, HSP32 i HSP27 u A549 stanicama izloženim ekstraktu dima cigareta različitih koncentracija (1,25 %, 2,5 %, 5 %, 10 % ili 20 %) tijekom 4 h, 6 h, 8 h, 24 h ili 48 h (slike 4.13. do 4.17.).

Inkubacijom A549 stanica s ekstraktom dima cigareta različitih koncentracija tijekom 4 h (slika 4.13.) nije došlo do statistički značajnih promjena u ekspresiji HSP70 (P=0,870), HSP32 (P=0,377) i HSP27 (P=0,833).



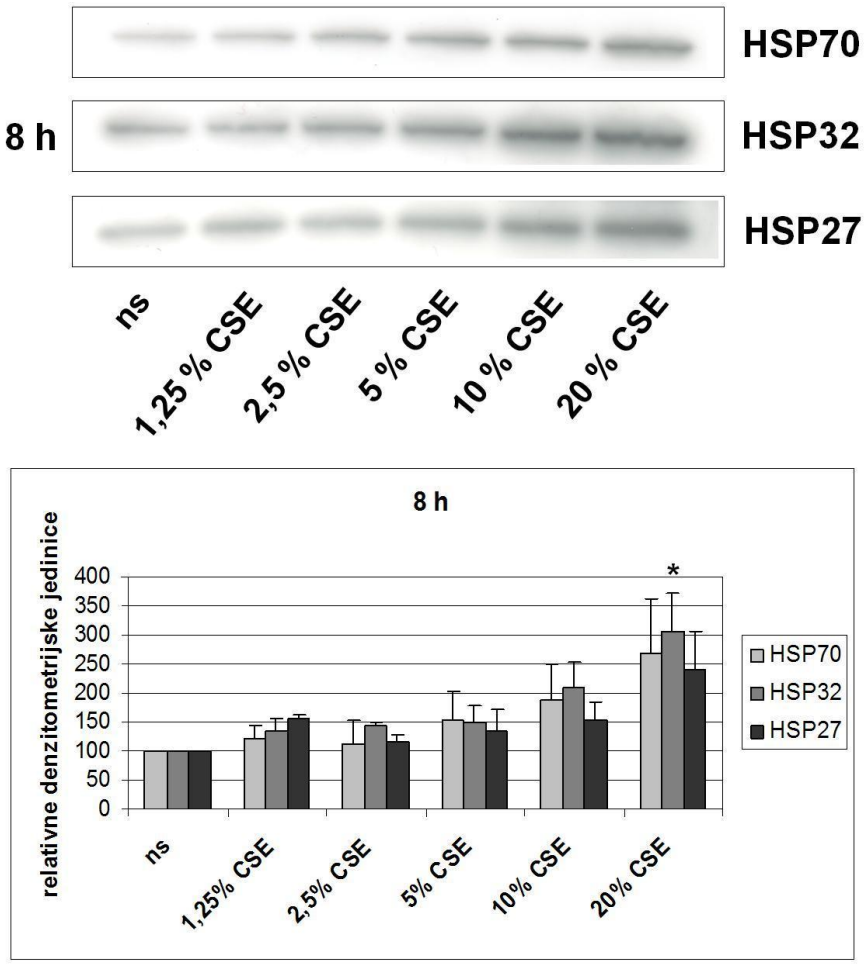
Slika 4.13. Western blot analiza ekspresije HSP u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta i grafički prikaz podataka dobivenih denzitometrijskom analizom vrpci (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, a izraženi su prema nestimuliranim stanicama označenima kao 100 %). Nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice.

Niti nakon 6 h inkubacije (slika 4.14.) A549 stanica s ekstraktom dima cigareta različitih koncentracija nije došlo do statistički značajnih promjena u ekspresiji HSP70 (P=0,691), HSP32 (P=0,134) i HSP27 (P=0,435).



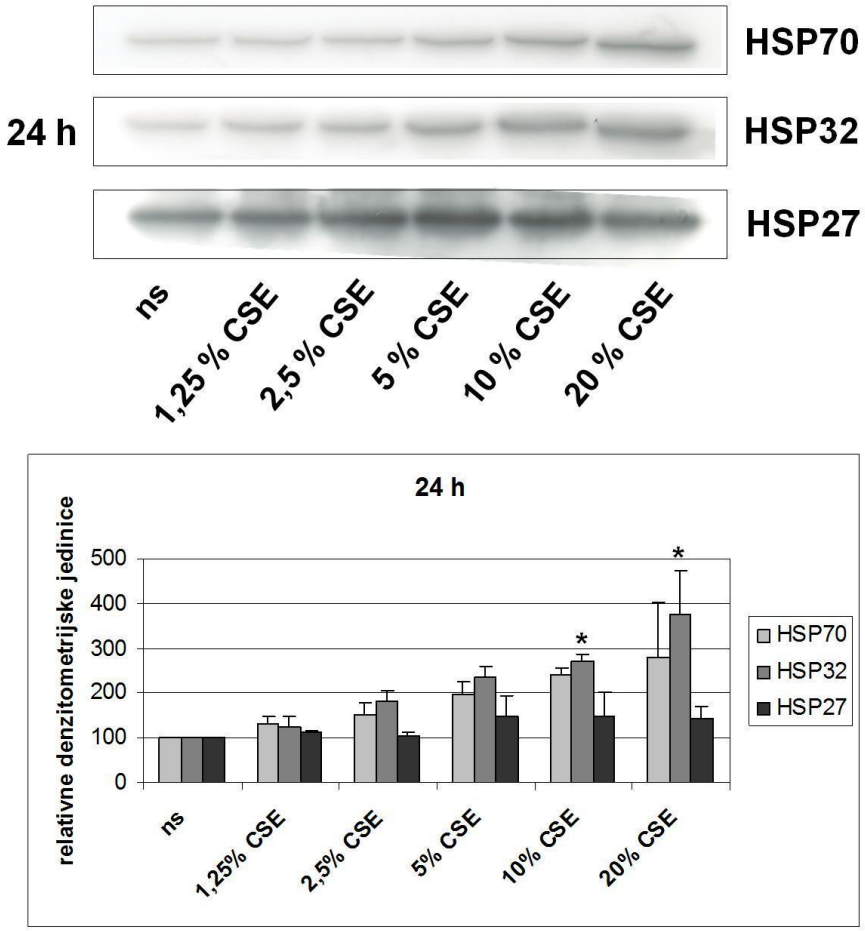
Slika 4.14. Western blot analiza ekspresije HSP u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 6 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta i grafički prikaz podataka dobivenih denzitometrijskom analizom vrpci (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, a izraženi su prema nestimuliranim stanicama označenima kao 100 %). Nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice.

Inkubacijom A549 stanica s ekstraktom dima cigareta različitih koncentracija tijekom 8 h (slika 4.15.) nije došlo do statistički značajnih promjena u ekspresiji HSP70 (P=0,290) i HSP27 (P=0,131) u odnosu na nestimulirane stanice. Međutim, pronašli smo statistički značajan porast ekspresije HSP32 u stanicama stimuliranim s 20 % CSE (P=0,029) tijekom 8 h u odnosu na nestimulirane stanice. Koncentracija dima od 20 % izazvala je porast ekspresije HSP32 i u odnosu na stanice izložene ektraktu dima cigareta u koncentracijama od 1,25 %, 2,5 % i 5 % (P=0,009, P=0,013 i P=0,016).



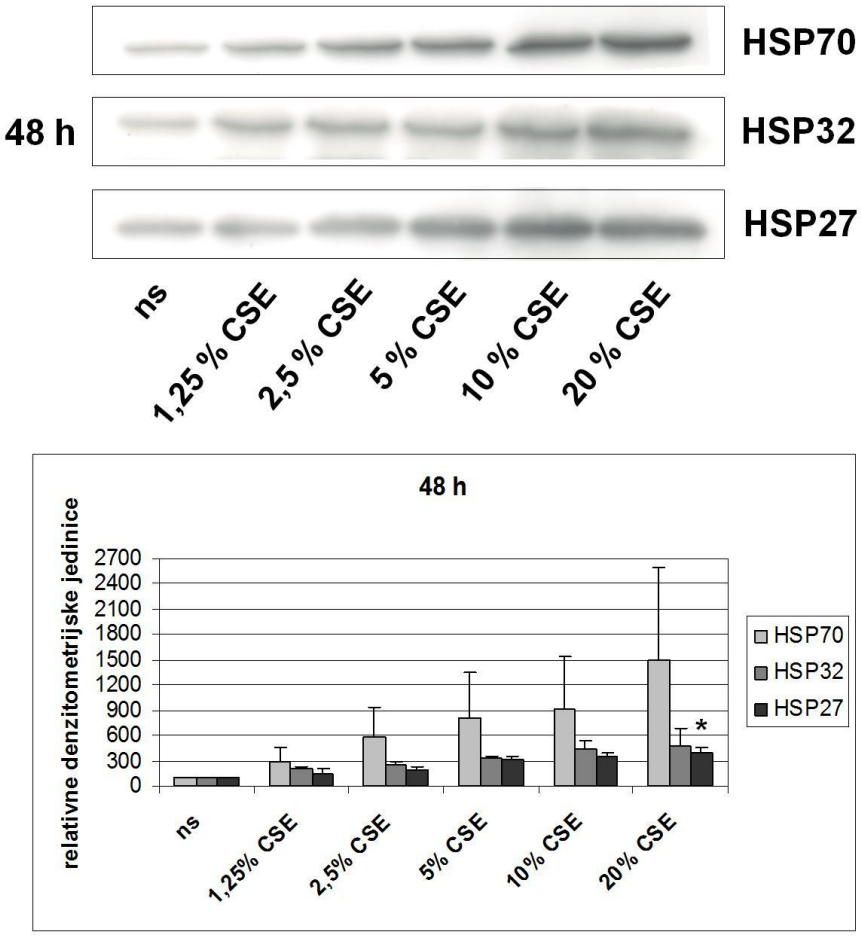
Slika 4.15. Western blot analiza ekspresije HSP u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 8 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta i grafički prikaz podataka dobivenih denzitometrijskom analizom vrpci (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, a izraženi su prema nestimuliranim stanicama označenima kao 100 %). Značajno različita ekspresija HSP32 u stanicama stimuliranim s 20 % CSE u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * P=0,029, dok za HSP70 i HSP27 nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice.

Nakon 24-satne inkubacije (slika 4.16.) ekstrakt dima cigareta također nije uzrokovao značajne promjene u ekspresiji HSP70 (P=0,133) i HSP27 (P=0,467), ali je potaknuo statistički značajan porast ekspresije HSP32 (P=0,019) pri koncentracijama ekstrakata dima cigareta od 10 % i 20 % u odnosu na nestimulirane stanice. Između stanica izloženih različitim koncentracijama ekstrakta dima cigareta nije bilo statistički značajnih razlika u ekspresiji HSP32.



Slika 4.16. Western blot analiza ekspresije HSP u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 24 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta i grafički prikaz podataka dobivenih denzitometrijskom analizom vrpci (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, a izraženi su prema nestimuliranim stanicama označenima kao 100 %). Značajno različita ekspresija HSP32 u stanicama stimuliranim s 10 % i 20 % CSE u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * P=0,019, dok za HSP70 i HSP27 nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice.

Nakon 48-satne inkubacije (slika 4.17.) A549 stanica s ekstraktom dima cigareta različitih koncentracija nije došlo do statistički značajnih promjena u ekspresiji HSP70 (P=0,548) i HSP32 (P=0,100), ali smo pronašli statistički značajan porast ekspresije HSP27 u stanicama stimuliranim s 20 % CSE (P=0,012) u odnosu na nestimulirane stanice. Između stanica izloženih različitim koncentracijama ekstrakta dima cigareta nije bilo statistički značajnih razlika u ekspresiji HSP27.



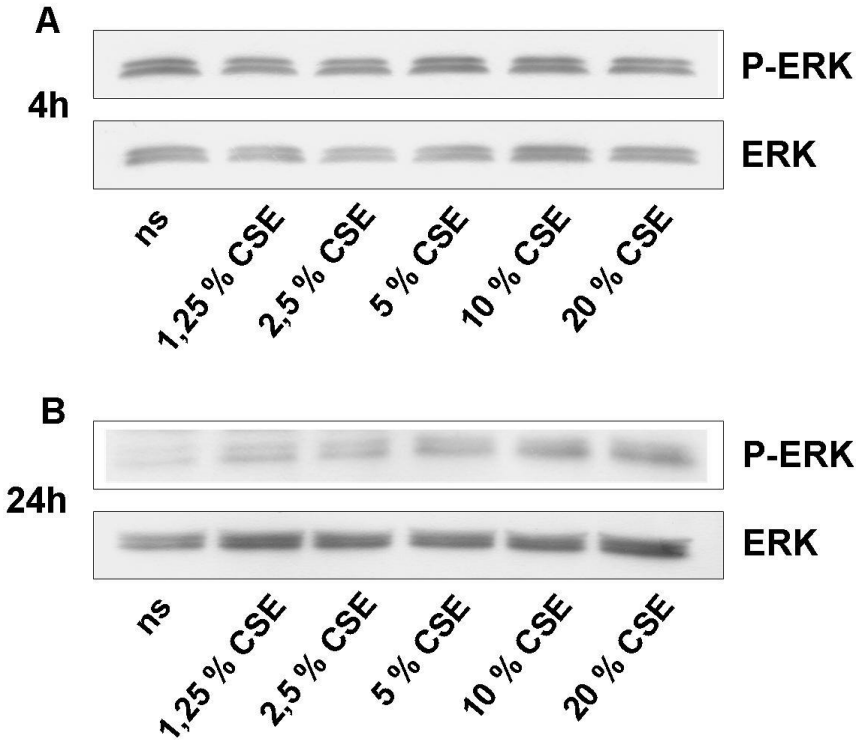
Slika 4.17. Western blot analiza ekspresije HSP u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 48 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta i grafički prikaz podataka dobivenih denzitometrijskom analizom vrpci (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, a izraženi su prema nestimuliranim stanicama označenima kao 100 %). Značajno različita ekspresija HSP27 u stanicama stimuliranim s 20 % CSE u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * P=0,012, dok za HSP70 i HSP32 nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice.

4.1.6. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na ekspresiju i aktivaciju MAPK u A549 stanicama

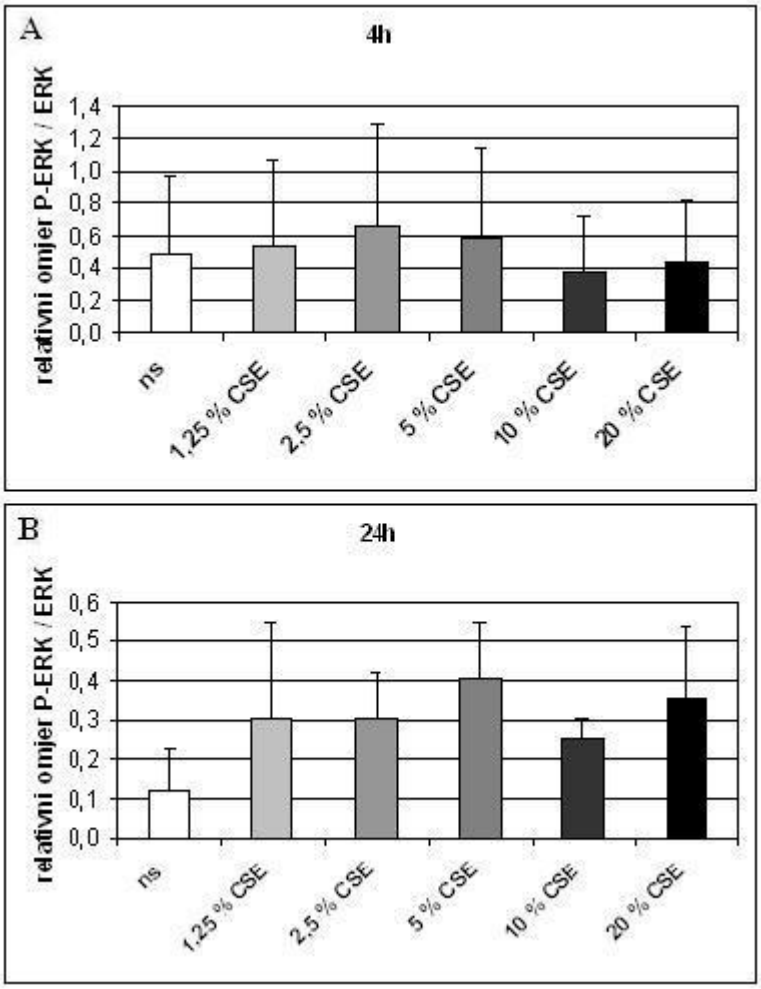
Stanice odgovaraju na različite vanjske podražaje aktivacijom specifičnih unutarstaničnih putova, poput signalne kaskade koja vodi do aktivacije MAPK, što može dovesti do proliferacije stanice, diferencijacije, smrti ili upalnog odgovora (Roux i Blenis, 2004). Da bismo ispitali je li aktivacija MAPK uključena u mehanizam citotoksičnosti ekstrakta dima cigareta, odredili smo ekspresiju i aktivaciju ERK, JNK i p38 u lizatima A549 stanica Western blot metodom.

Ekstrakt dima cigareta, neovisno o primijenjenoj koncentraciji i / ili vremenu izloženosti, nije značajno utjecao na razinu ekspresije ukupnih ERK, JNK i p38. Međutim, različito je utjecao na aktivaciju pojedine MAPK (slike 4.18. do 4.23.).

Inkubacijom A549 stanica s ekstraktom dima cigareta nije došlo do značajnijih promjena u aktivaciji ERK tijekom 4 h (P=0,990) ili 24 h (P=0,839) u odnosu na nestimulirane stanice (slike 4.18. i 4.19.).

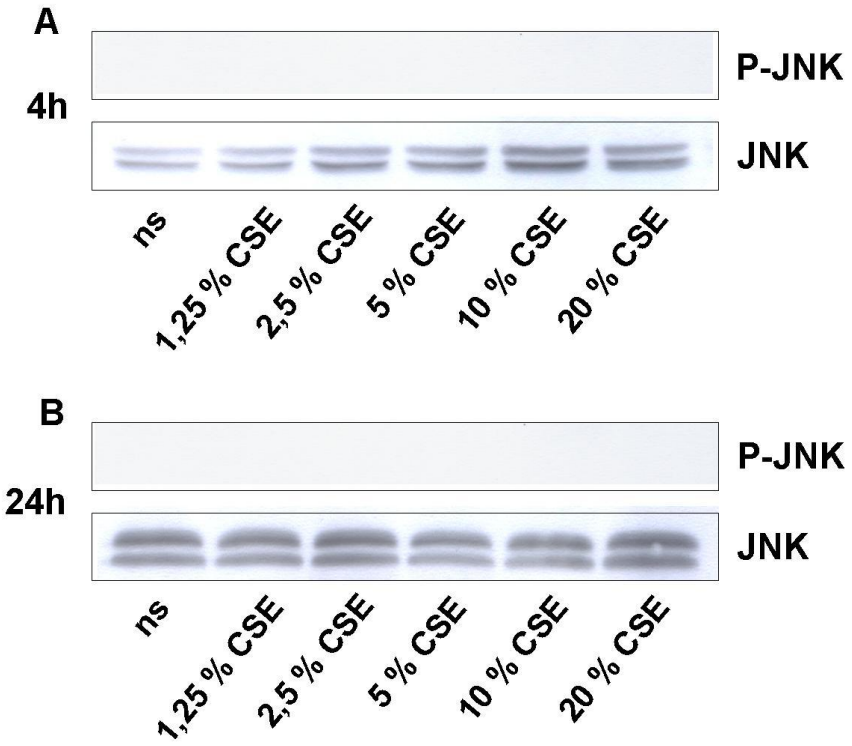


Slika 4.18. Western blot analiza ekspresije ukupne ERK (44 kDa ERK1 i 42 kDa ERK2) i aktivirane ERK (P-ERK) u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta.

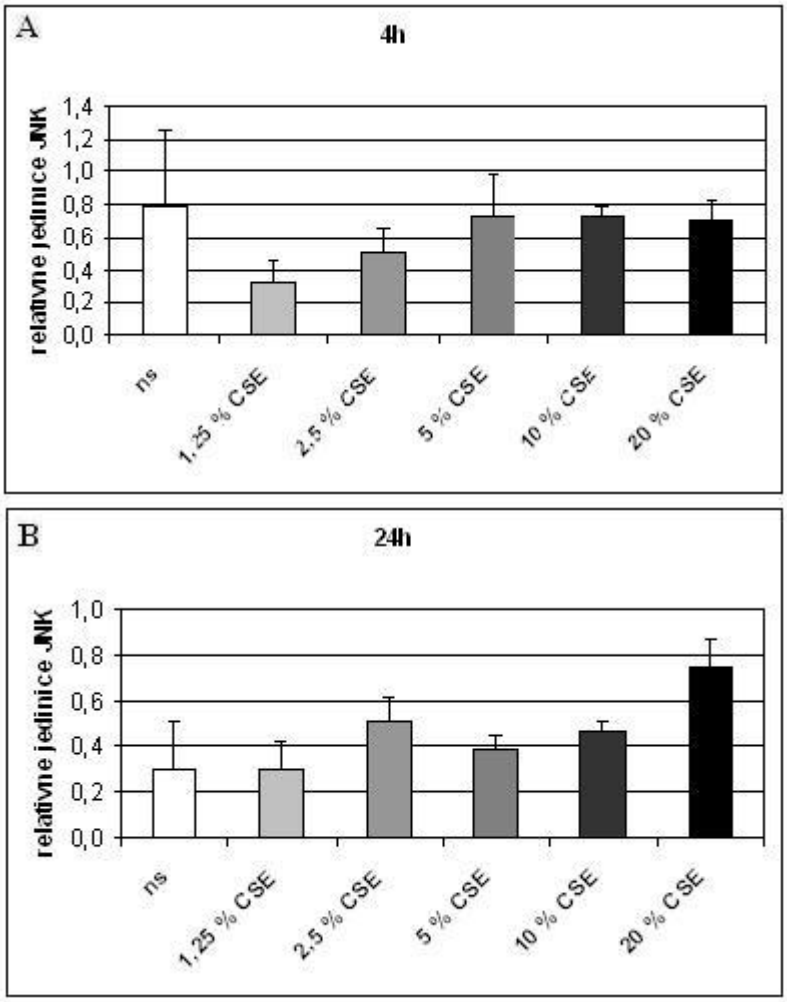


Slika 4.19. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na aktivaciju ERK u A549 stanicama. Stanice su izložene djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Grafički su prikazani podaci dobiveni denzitometrijskom analizom vrpci iz tri neovisna Western blot eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška relativnih omjera ekspresije aktivirane ERK (P-ERK) i ukupne ERK. Nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice (P=0,990 za 4 h; P=0,839 za 24 h).

Aktivaciju JNK nismo uspjeli detektirati ni u nestimuliranim stanicama niti u stanicama izloženim ekstraktu dima cigareta nakon 4 h inkubacije, kao niti nakon 24 h (slike 4.20. i 4.21.).

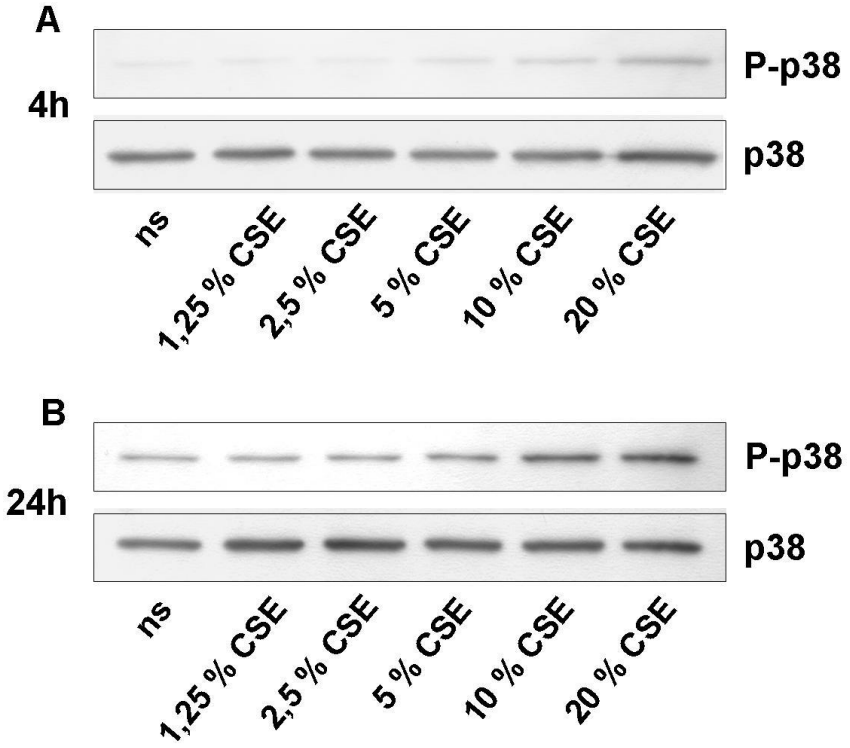


Slika 4.20. Western blot analiza ekspresije ukupne JNK (46 kDa JNK1 i 55 kDa JNK2) i aktivirane JNK (P-JNK) u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta.

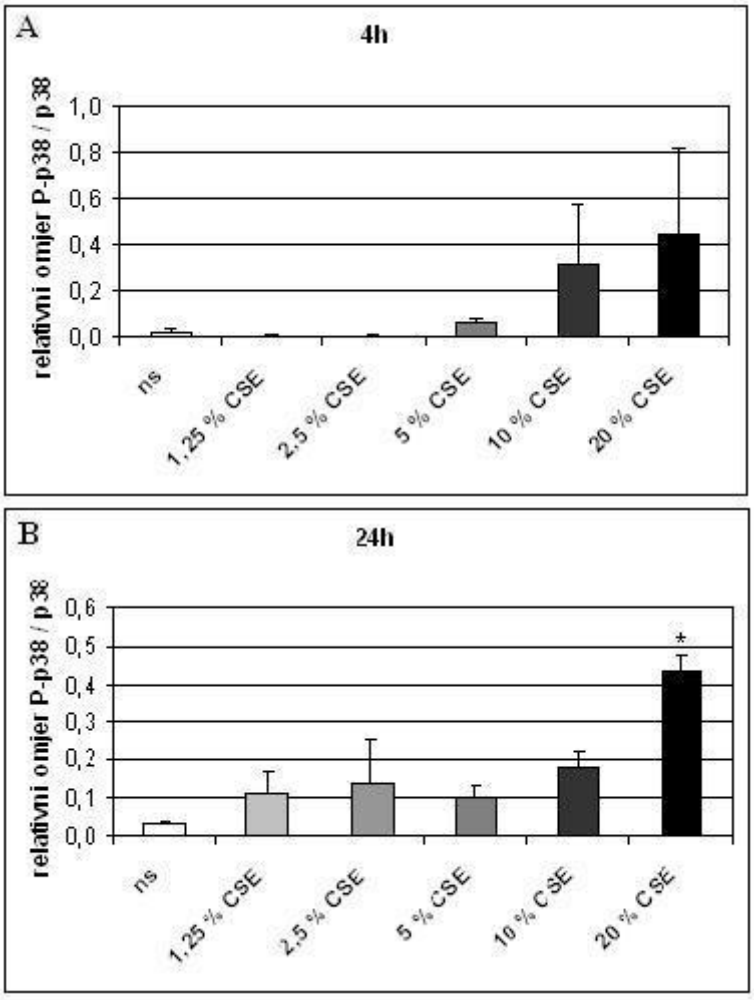


Slika 4.21. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na aktivaciju JNK u A549 stanicama. Stanice su izložene djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Grafički su prikazani podaci dobiveni denzitometrijskom analizom vrpci iz tri neovisna Western blot eksperimenta. Budući da nismo detektirali aktivaciju JNK, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška relativnih jedinica ekspresije ukupne JNK. Nisu pronađene statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice (P=0,495 za 4 h; P=0,337 za 24 h).

Analizom aktivacije p38 utvrdili smo da ekstrakt dima cigareta dovodi do granično značajnog porasta razine aktivirane p38 nakon 4-satne inkubacije u odnosu na nestimulirane stanice (P=0,049). Nakon 24-satne inkubacije razina aktivirane p38 je statistički značajno veća u stanicama tretiranim s 20 % ekstraktom dima cigareta u odnosu na nestimulirane stanice (P<0,001) (slike 4.22. i 4.23.). Koncentracija dima od 20 % izazvala je značajan porast razine aktivirane p38 nakon 24 h i u odnosu na stanice izložene ektraktu dima cigareta u koncentracijama od 1,25 %, 2,5 %, 5 % i 10 % (P=0,003, P=0,005, P=0,002 i P=0,012).



Slika 4.22. Western blot analiza ekspresije ukupne p38 (38 kDa) i aktivirane p38 (P-p38) u lizatima A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi iz tri neovisna eksperimenta.

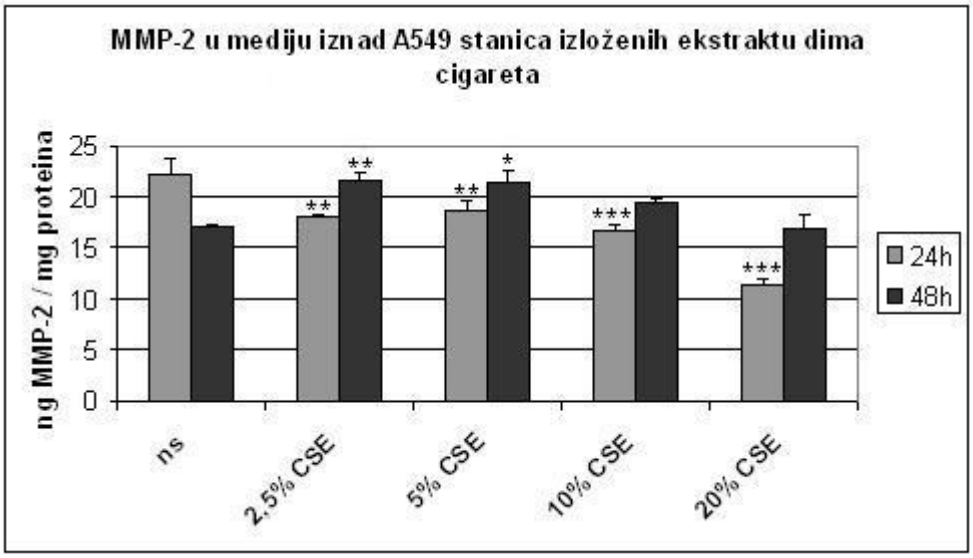


Slika 4.23. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na aktivaciju p38 u A549 stanicama. Stanice su izložene djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 4 h (A) i 24 h (B). Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Grafički su prikazani podaci dobiveni denzitometrijskom analizom vrpci iz tri neovisna Western blot eksperimenta. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška relativnih omjera ekspresije aktivirane p38 (P-p38) i ukupne p38. Značajno različita razina aktivirane p38 u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * $P<0,001$.

4.1.7. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje MMP-2, MMP-9 i TIMP-1 u medij iznad A459 stanica

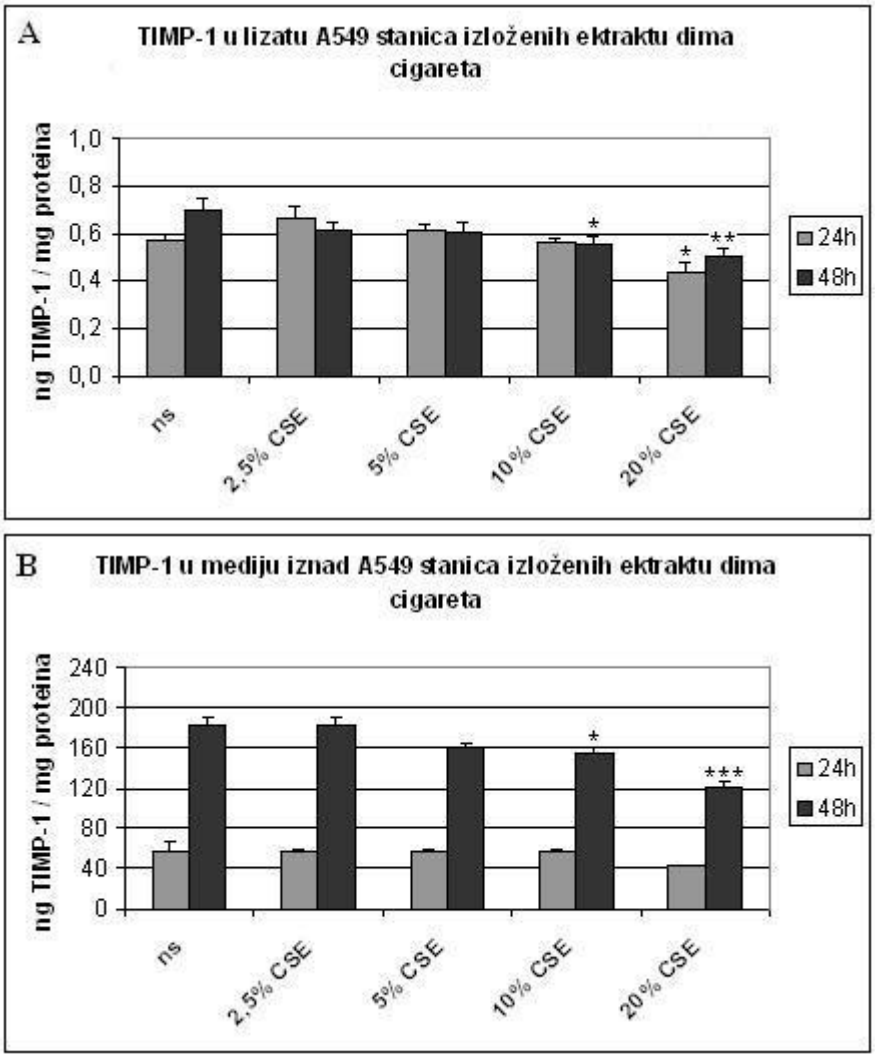
Metaloproteinaze matriksa MMP-2 i MMP-9 zajedno s njihovim tkivnim inhibitorom TIMP-1 imaju važnu ulogu u remodeliranju izvanstaničnog matriksa. Stoga smo ispitali utjecaj ekstrakta dima cigareta na promjene u njihovom otpuštanju iz A549 epitelnih stanica u medij. Rezultati su pokazali da su koncentracija MMP-2 u lizatu A549 stanica te koncentracija MMP-9 u lizatu i mediju iznad A549 stanica ispod granice detekcije korištenih ELISA testova.

Koncentracija MMP-2 u mediju iznad A549 stanica nakon 24 h inkubacije bila je statistički značajno snižena pri svim koncentracijama ekstrakta dima cigareta u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,01$) (slika 4.24.). Štoviše, pri koncentraciji dima od 20 % koncentracija MMP-2 bila je značajno niža i u odnosu na stanice izložene ektraktu dima cigareta u koncentracijama od 2,5 %, 5 % i 10 % ($P<0,001$, $P<0,001$ i $P=0,001$). Međutim, nakon 48 h inkubacije, koncentracija MMP-2 u mediju se značajno povisila pri koncentracijama ekstrakta dima cigareta od 2,5 % i 5 % u odnosu na nestimulirane stanice ($P<0,01$ i $P<0,05$) te u odnosu na koncentraciju dima od 20 % ($P<0,01$ i $P=0,01$). Usporedbom različitih vremena inkubacije u mediju iznad nestimuliranih stanica koncentracija MMP-2 je bila značajno niža nakon 48 h u odnosu na 24 h ($P<0,05$), dok je u mediju iznad stanica stimuliranih s ektraktom dima cigareta koncentracija 2,5 %, 10 % i 20 % bila značajno viša nakon 48 h u odnosu na 24 h ($P<0,05$, $P=0,01$ i $P<0,05$).



Slika 4.24. Grafički prikaz koncentracije MMP-2 u mediju iznad A549 stanica izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 24 h i 48 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3). Značajno različita koncentracija MMP-2 u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * P<0,05, ** P<0,01 i *** P<0,001.

Koncentracija TIMP-1 u lizatu A549 stanica nakon 24 h inkubacije bila je statistički značajno snižena pri koncentraciji ekstrakta dima cigareta od 20 % u odnosu na nestimulirane stanice (P<0,05) (slika 4.25. A). Štoviše, pri koncentraciji dima od 20 % koncentracija TIMP-1 u lizatu bila je značajno niža i u odnosu na stanice izložene ektraktu dima cigareta u koncentracijama od 2,5 %, 5 % i 10 % (P<0,001, P<0,01 i P<0,05). Međutim, tijekom 24 h nije došlo do statistički značajnih promjena u koncentraciji TIMP-1 u mediju iznad A549 stanica (slika 4.25. B). Nakon 48 h inkubacije značajno se snizila koncentracija TIMP-1 i u lizatu i u mediju iznad A549 stanica izloženih ekstraktu dima cigareta u koncentracijama od 10 % i 20 % u odnosu na nestimulirane stanice (P<0,05 i P<0,01) (slika 4.25. A i B). Između stanica izloženih različitim koncentracijama ekstrakta dima cigareta nakon 48 h nije bilo značajnih razlika u koncentraciji TIMP-1 u lizatu, dok je u mediju pri koncentraciji dima od 20 % koncentracija TIMP-1 bila značajno niža i u odnosu na stanice izložene ektraktu dima cigareta u koncentracijama od 2,5 %, 5 % i 10 % (P<0,001, P<0,01 i P<0,01). Usporedbom različitih vremena inkubacije (24 h i 48 h) koncentracija TIMP-1 u lizatu se nije značajno razlikovala, dok je u mediju iznad stanica bila značajno viša nakon 48 h u odnosu na 24 h kako iznad nestimuliranih stanica, tako i za sve ispitane koncentracije dima cigareta (P<0,001).



Slika 4.25. Grafički prikaz koncentracije TIMP-1 u lizatu (A) i mediju iznad A549 stanica (B) izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) različitih koncentracija tijekom 24 h i 48 h. Skraćenica: ns = nestimulirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3). Značajno različita koncentracija TIMP-1 u odnosu na nestimulirane stanice označena je s * P<0,05, ** P<0,01 i *** P<0,001.

4.2. ISPITIVANJA PROVEDENA NA BOLESNICIMA S KOPB-om I ZDRAVIM ISPITANICIMA

4.2.1. Kliničke i demografske karakteristike ispitanika

Istraživanje je provedeno na uzorcima od ukupno 137 bolesnika s KOPB-om i 48 zdravih ispitanika. Kliničke i demografske karakteristike ispitivanih skupina prikazane su u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Kliničke i demografske karakteristike ispitivanih skupina. Za statistički značajne razlike uzete su vrijednosti kod kojih je P<0,05. Kvalitativne varijable prikazane su kao apsolutni brojevi ili postoci, a kvantitativne kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrole označene su s * P<0,001.

	kontrole	**KOPB**	**GOLD 2**	**GOLD 3**	**GOLD 4**
N	48	137	42	63	32
spol (M / Ž)	23 / 25	107 / 30	33 / 9	48 / 15	26 / 6
dob (godine)	53 (47 - 57)	70 (63 - 75)*	72 (61 - 77)*	71 (66 - 75)*	67 (55 - 72)*
pušači / bivši pušači / nepušači (%)	35,4 / 31,3 / 33,3	26,3 / 35,3 / 38,4	22,5 / 40,0 / 37,5	24,2 / 33,9 / 41,9	35,4 / 32,3 / 33,3
FEV_1 (% predv.)	105,3 (96,5 - 116,9)	41,4 (30,8 - 52,0)*	58,5 (52,3 - 65,0)*	41,0 (35,4 - 45,0)*	24,0 (20,0 - 25,7)*
FEV_1/FVC (%)	84,3 (80,2 - 89,3)	61,5 (51,7 - 67,0)*	65,0 (59,2 - 70,8)*	61,9 (50,7 - 67,0)*	54,4 (42,1 - 62,0)*

Dokazane su statistički značajne razlike u parametrima plućne funkcije (FEV_1 i FEV_1/FVC) između bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika (P<0,001). Prema tim parametrima bolesnici su podijeljeni u podskupine ovisno o težini bolesti (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4). Nisu nađene statistički značajne razlike u udjelu muškaraca i žena, niti u udjelu pušača, bivših pušača i nepušača između pojedinih skupina. Skupina bolesnika s KOPB-om bila je značajno starija u odnosu na zdrave ispitanike (P<0,001).

4.2.2. Biljezi upale u ispitivanim skupinama

Koncentracije upalnih biljega u ispitivanim skupinama prikazane su u tablici 4.3.

Tablica 4.3. Koncentracije upalnih biljega u zdravih ispitanika (N=38) i bolesnika s KOPB-om (N=106) podijeljenih u podskupine prema GOLD-u (prema Somborac Bačura i sur., 2012). Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrole označene su s * P<0,001.

	kontrole	**KOPB**	**GOLD 2**	**GOLD 3**	**GOLD 4**
ukupni leukociti (x 10^9 / L)	7,0 (5,9 - 8,2)	9,9 (7,8 - 12,7)*	9,3 (7,7 - 10,8)*	9,9 (7,9 - 13,3)*	11,7 (8,0 - 13,7)*
segmentirani neutrofili (%)	55 (51 - 59)	70 (59 - 76)*	67 (60 - 72)*	70 (59 - 77)*	70 (60 - 76)*
monociti (%)	7,5 (6,0 - 9,0)	7,0 (5,0 - 9,0)	7,0 (5,0 - 10,0)	7,0 (5,0 - 8,0)	7,0 (4,8 - 7,3)
limfociti (%)	35 (31 - 38)	17 (12 - 27)*	20 (14 - 27)*	18 (15 - 28)*	14 (10 - 25)*
CRP (mg/L)	8,15 (3,24 - 9,85)	13,46 (8,35 - 46,21)*	12,98 (8,02 - 28,07)*	12,59 (7,60 - 63,62)*	23,18 (11,21 - 39,17)*

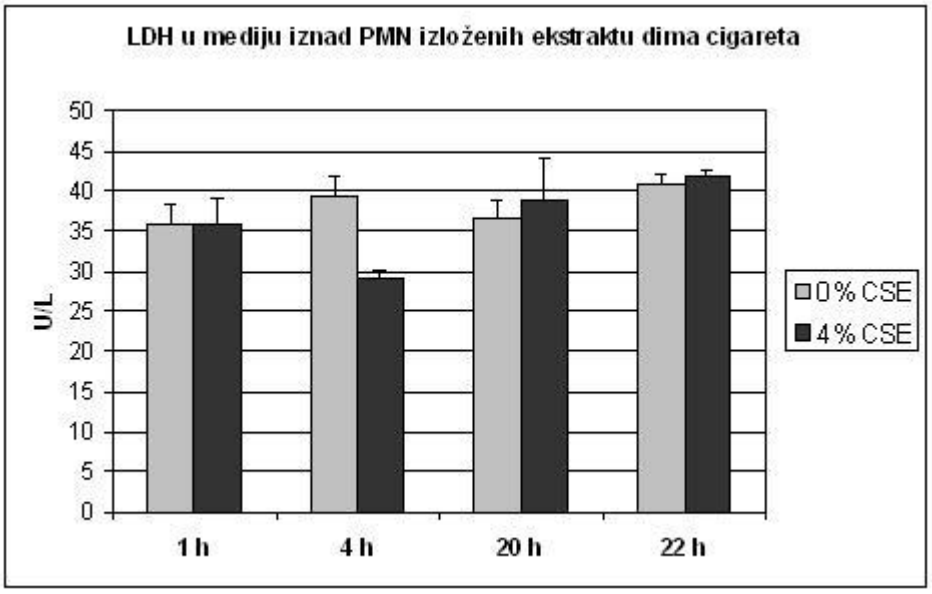
Dokazana je statistički značajno veća koncentracija ukupnih leukocita, segmentiranih neutrofila i CRP-a između svih bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika (P<0,001), kao i između podskupina bolesnika (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4) i zdravih ispitanika (P<0,001). Jedino je udio limfocita u krvi svih bolesnika s KOPB-om i u svim podskupinama bio značajno snižen u odnosu na zdrave ispitanike (P<0,001). Nisu nađene statistički značajne razlike u udjelu monocita u pojedinim skupinama (Somborac Bačura i sur., 2012).

4.2.3. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na polimorfonuklearne leukocite

Polimorfonuklearni leukociti (PMN) pod utjecajem različitih stimulansa otpuštaju sadržaj iz svojih granula u okolinu. Preliminarni pokus pokazao je da inkubacija PMN s 4 % ekstraktom dima cigareta tijekom 22 h dovodi do povećanog otpuštanja MMP-9 u medij iznad PMN (podaci nisu prikazani). Stoga smo najprije ispitali kako 4 % ekstrakt dima cigareta utječe na vijabilnost PMN tijekom vremena (mjerenjem otpuštanja LDH u medij), a zatim smo izolirali PMN iz pune krvi bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika, tretirali ih s 4 % ekstraktom dima cigareta te smo u mediju iznad PMN odredili koncentracije MMP-9 i TIMP-1.

4.2.3.1. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje LDH u medij iznad polimorfonuklearnih leukocita

Citotoksičnost ekstrakta dima cigareta prema PMN određena je mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad PMN. PMN izolirani iz jednog nasumično odabranog zdravog ispitanika tretirani su svježe pripremljenim ekstraktom dima cigareta u koncentraciji od 0 % i 4 % tijekom 1 h, 4 h, 20 h ili 22 h (slika 4.26.).



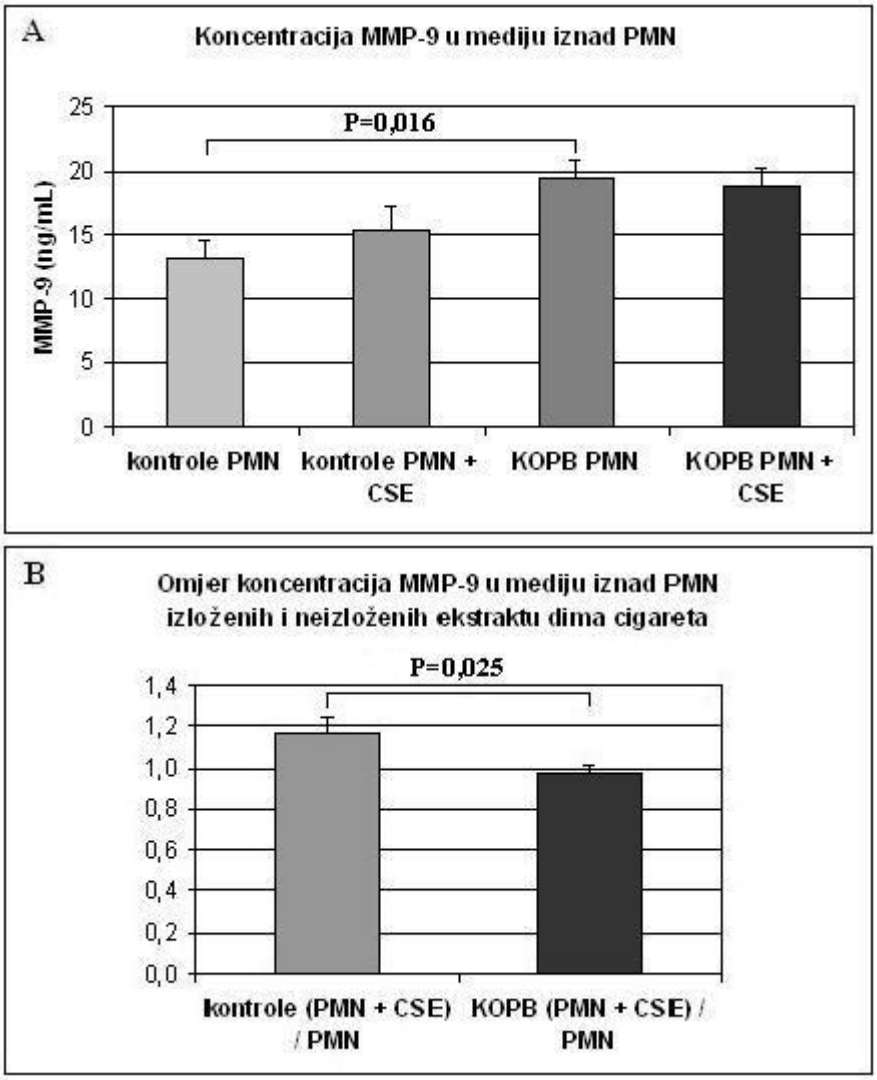
Slika 4.26. Grafički prikaz katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad polimorfonuklearnih leukocita (PMN) izloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta (CSE) u koncentraciji od 4 % u odnosu na medij iznad PMN koji nisu bili izloženi ekstraktu dima cigareta (0 % CSE) tijekom 1 h, 4 h, 20 h ili 22 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3). Nisu pronađene statistički značajne razlike (P=0,086).

Vidljivo je da inkubacija PMN s ekstraktom dima cigareta u koncentraciji od 4 % tijekom različitih vremena ne dovodi do značajnijeg otpuštanja LDH u medij u odnosu na PMN koji nisu bili izloženi ekstraktu dima cigareta (P=0,086). To nam pokazuje da tijekom ispitivanih vremenskih perioda ne dolazi do značajnijeg umiranja PMN izloženih ekstraktu dima cigareta u odnosu na one koji nisu bili izloženi.

4.2.3.2. Utjecaj ekstrakta dima cigareta na otpuštanje MMP-9 i TIMP-1 u medij iznad polimorfonuklearnih leukocita

Stimulacijom zrelih neutrofila ne dolazi do sinteze MMP-9, već se može izazvati brzo otpuštanje ovog enzima degranulacijom. Stoga smo ispitali kako 4 % ekstrakt dima cigareta utječe na otpuštanje MMP-9 i TIMP-1 iz PMN izoliranih iz pune krvi bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika tijekom inkubacije od 20 h. Rezultati promjena u koncentraciji MMP-9 u mediju iznad PMN su prikazani na slici 4.27., dok je koncentracija TIMP-1 bila ispod granice detekcije korištenog ELISA testa.

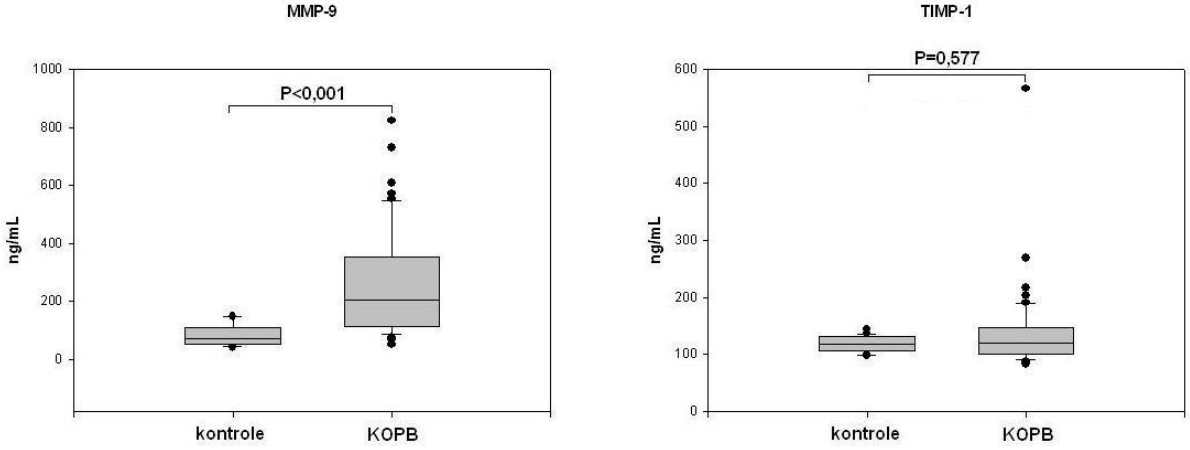
Koncentracija MMP-9 u mediju iznad PMN bolesnika s KOPB-om koji nisu bili izloženi ekstraktu dima cigareta bila je statistički značajno veća (P=0,016) u odnosu na PMN zdravih kontrola također neizloženih ekstraktu dima cigareta. Međutim, nakon izlaganja PMN zdravih kontrola ekstraktu dima cigareta, nema statistički značajne razlike u odnosu na PMN bolesnika s KOPB-om izloženih ekstraktu dima cigareta (slika 4.27. A). Omjer koncentracija MMP-9 u mediju iznad PMN svakog pojedinačnog ispitanika izloženih i neizloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta daje statistički značajnu razliku (P=0,025) između zdravih kontrola i bolesnika s KOPB-om (slika 4.27. B).



Slika 4.27. Grafički prikaz koncentracije MMP-9 u mediju iznad polimorfonuklearnih leukocita (PMN) izoliranih iz pune krvi zdravih ispitanika (N=9) i bolesnika s KOPB-om (N=23) izloženih i neizloženih djelovanju 4 % ekstrakta dima cigareta (CSE) tijekom 20 h (A) te omjera koncentracija MMP-9 u mediju iznad PMN svakog ispitanika izloženih i neizloženih djelovanju 4 % CSE tijekom 20 h (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Za statistički značajne razlike uzete su vrijednosti kod kojih je $P<0,05$.

4.2.4. Dijagnostička vrijednost određivanja koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u plazmi

U plazmi ispitanika određene su koncentracije MMP-9 i TIMP-1 (slika 4.28.). Pronađena je statistički značajno veća koncentracija MMP-9 u plazmi bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave ispitanike (P<0,001). Međutim, nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji TIMP-1 (P=0,577).



Slika 4.28. Grafički prikaz koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u plazmi zdravih ispitanika (N=21) i bolesnika s KOPB-om (N=59). Za statistički značajne razlike uzete su vrijednosti kod kojih je P<0,05.

Tablica 4.4. Koncentracije MMP-9 i TIMP-1 u plazmi zdravih ispitanika (N=21) i bolesnika s KOPB-om (N=59) podijeljenih u podskupine prema GOLD-u. Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrole označene su s * P<0,001, dok je statistički značajna razlika u odnosu na GOLD 2 podskupinu označena s # P=0,003.

	MMP-9 (ng/mL)	**TIMP-1 (ng/mL)**
kontrole	70,25 (52,48 - 104,96)	118,97 (106,41 - 130,77)
KOPB	204,13 (115,70 - 351,24)*	121,03 (101,80 - 145,90)
GOLD 2	197,52 (105,37 - 331,82)*	136,92 (119,49 - 174,36)
GOLD 3	225,62 (116,32 - 351,24)*	120,00 (105,90 - 143,33)
GOLD 4	200,00 (124,79 - 345,46)*	102,05 (92,31 - 124,10)#

Između podskupina bolesnika s KOPB-om (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4) nisu pronađene statistički značajne razlike u koncentraciji MMP-9. Ipak, u svim podskupinama koncentracija MMP-9 je bila statistički značajno veća nego u zdravih ispitanika (P<0,001) (tablica 4.4.). Koncentracija TIMP-1 se nije značajno razlikovala između zdravih ispitanika i podskupina bolesnika s KOPB-om (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4), ali je u GOLD 4 podskupini nađena statistički značajno manja koncentracija TIMP-1 nego u GOLD 2 podskupini bolesnika (P=0,003).

S obzirom da je skupina bolesnika s KOPB-om bila značajno starija u odnosu na skupinu zdravih ispitanika (tablica 4.2), ispitali smo mogući utjecaj dobi na koncentracije MMP-9 i TIMP-1. Linearna regresijska analiza pokazala je da nema korelacija između ovih parametara i dobi ni u zdravih ispitanika niti u bolesnika s KOPB-om (tablica 4.5.), ukazujući na to da dob ne utječe na koncentracije MMP-9 i TIMP-1.

Tablica 4.5. Spearmanovi koeficijenti korelacije i pripadajuće P vrijednosti za skupinu zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om. Za statistički značajnu povezanost uzimaju se vrijednosti kod kojih je r > 0,25 ili r < -0,25 uz P<0,05.

	dob (kontrole)		**dob (KOPB)**	
	r	**P**	**r**	**P**
MMP-9	0,123	0,589	-0,093	0,481
TIMP-1	0,399	0,072	0,186	0,158

Ispitivanje utjecaja pušenja na koncentracije MMP-9 i TIMP-1 prikazano je u tablici 4.6. Ni u skupini zdravih ispitanika niti u skupini bolesnika s KOPB-om nisu pronađene statistički značajne razlike u koncentraciji MMP-9 između pušača i nepušača (P>0,05). Međutim, statistički značajno niža koncentracija TIMP-1 nađena je kod zdravih pušača u usporedbi sa zdravim nepušačima (P=0,035), dok u skupini bolesnika s KOPB-om podijeljenih prema pušačkom statusu nije bilo statistički značajnih razlika (P>0,05). Nadalje, statistički značajno veća koncentracija MMP-9 nađena je u bolesnika s KOPB-om pušača i nepušača u odnosu na zdrave ispitanike pušače i nepušače (P<0,001), dok razlika u koncentraciji TIMP-1 između bolesnika s KOPB-om pušača i nepušača te zdravih ispitanika pušača i nepušača nije bilo (P>0,05).

Tablica 4.6. Koncentracije MMP-9 i TIMP-1 u plazmi zdravih ispitanika (N=21) i bolesnika s KOPB-om (N=59) podijeljenih prema pušačkom statusu. Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila). Za statistički značajnu razliku uzeta je vrijednost P<0,05.

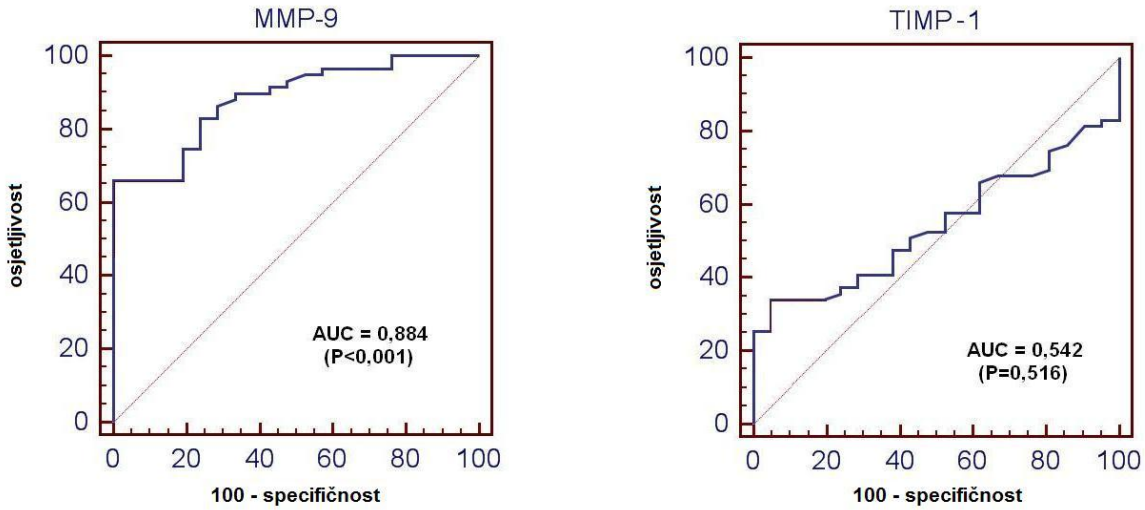
	kontrole			**KOPB**		
	pušači (N=11)	**nepušači (N=10)**	**P**	**pušači (N=26)**	**nepušači (N=33)**	**P**
MMP-9 (ng/mL)	76,86 (48,35-143,18)	69,84 (54,55-96,69)	0,597	259,92 (118,18-404,13)*	190,91 (114,26-286,98)#	0,131
TIMP-1 (ng/mL)	108,72 (101,80-121,28)	126,15 (115,90-135,39)	0,035	117,44 (94,36-146,67)	124,10 (105,39-145,13)	0,317

* P<0,001 (u odnosu na kontrolne pušače);
# P<0,001 (u odnosu na kontrolne nepušače).

Analizom ROC krivulja za koncentracije MMP-9 i TIMP-1 ispitali smo dijagnostičku točnost ovih parametara (tablica 4.7. i slika 4.29.). Rezultati su pokazali vrlo dobru dijagnostičku točnost za koncentraciju MMP-9 uz površinu ispod ROC krivulje (eng. *area under the ROC curve*, AUC) od 0,884 i 95 % interval pouzdanosti od 0,793 - 0,945 (P<0,001), dok se za koncentraciju TIMP-1 pokazalo da se ne može koristiti kao diskriminacijski parametar za razlikovanje zdravih od bolesnih (AUC = 0,542; 95 % interval pouzdanosti = 0,426 - 0,654; P= 0,516), što je u skladu s nepromijenjenim vrijednostima ovog parametra između bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika. Na temelju ovih rezultata možemo predložiti optimalnu graničnu vrijednost koncentracije MMP-9 za razlikovanje zdravih od bolesnih. Za koncentraciju MMP-9 vrijedi da ukoliko je manja od 147,93 ng/mL vjerojatnije se radi o zdravoj osobi (specifičnost = 100 %), a ukoliko je veća od 147,93 ng/mL vjerojatnije se radi o bolesnoj osobi (osjetljivost = 66 %).

Tablica 4.7. Dijagnostička točnost ispitana analizom ROC krivulja za koncentracije MMP-9 i TIMP-1 u plazmi.

	AUC	**95 % interval pouzdanosti**	**P**	**osjetljivost (%)**	**specifičnost (%)**	**optimalna granična vrijednost**
MMP-9	0,884	0,793 - 0,945	<0,001	66	100	>147,93 ng/mL
TIMP-1	0,542	0,426 - 0,654	0,516	34	95	>136,41 ng/mL



Slika 4.29. ROC krivulje za koncentracije MMP-9 i TIMP-1.

Univarijatna logistička regresijska analiza koncentracija MMP-9 i TIMP-1 te biljega upale pokazala je da su koncentracija MMP-9, koncentracija ukupnih leukocita, segmentiranih neutrofila, limfocita i CRP-a dijagnostički prediktori KOPB-a (P<0,05). Multivarijatnom logističkom regresijskom analizom pokazali smo da model koji uključuje koncentraciju MMP-9, udio segmentiranih neutrofila i limfocita u krvi te koncentraciju CRP-a klasificira ova četiri parametra kao neovisne prediktore bolesti, povećavajući dijagnostičku točnost (AUC = 0,975; 95 % interval pouzdanosti = 0,913 - 0,997; P<0,05) (tablica 4.8.).

Tablica 4.8. Univarijatna i multivarijatna logistička regresijska analiza koncentracija MMP-9 i TIMP-1 te biljega upale. Za statistički značajne razlike uzete su vrijednosti kod kojih je P<0,05.

	univarijatna		**multivarijatna**	
	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	**P**	**omjer izgleda** (95 % interval pouzdanosti)	**P**
MMP-9	1,0280 (1,0119 - 1,0443)	0,0006	1,0358 (1,0091 - 1,0632)	0,0082
TIMP-1	1,0116 (0,9927 - 1,0308)	0,2309	-	-
ukupni leukociti	1,5708 (1,2079 - 2,0427)	0,0008	-	-
segmentirani neutrofili	1,0781 (1,0255 - 1,1334)	0,0032	0,5787 (0,3402 - 0,9844)	0,0436
monociti	0,9543 (0,7800 - 1,1676)	0,6496	-	-
limfociti	0,8871 (0,8327 - 0,9450)	0,0002	0,4807 (0,2515 - 0,9186)	0,0266
CRP	1,2935 (1,0976 - 1,5244)	0,0021	1,3235 (1,0054 - 1,7423)	0,0457

4.2.5. Određivanje polimorfizama *MMP9* gena

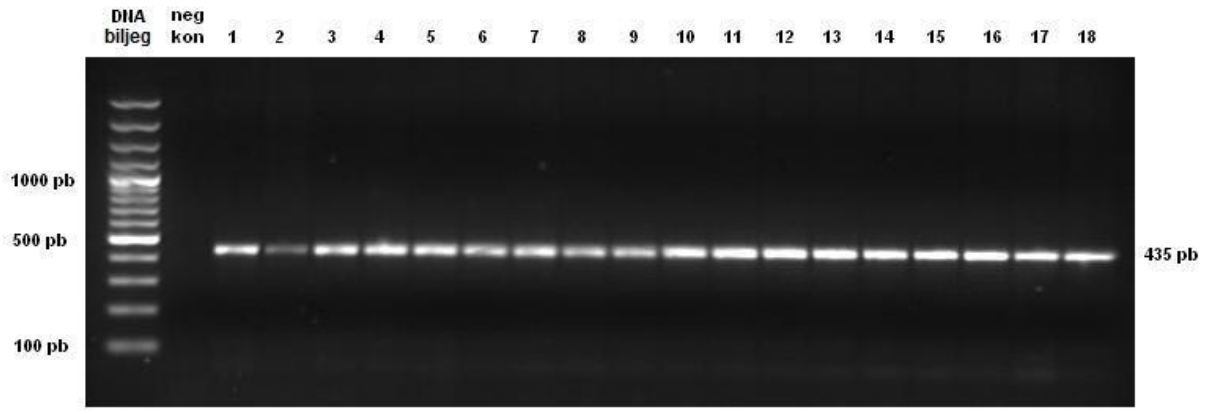
Zamjena nukeotida C nukleotidom T na poziciji -1562 u promotorskoj regiji *MMP9* gena dovodi do stvaranja polimorfnog mjesta **-1562 C/T** koje prepoznaje **SphI** restrikcijska endonukleaza.

Kada u egzonu 6 *MMP9* gena u triplet kodonu CAG koji kodira za aminokiselinu Gln dođe do zamjene nukeotida A nukleotidom G, nastaje triplet CGG (kodon za aminokiselinu Arg) što rezultira nastajanjem polimorfnog mjesta **Q279R** koje se detektira upotrebom **SmaI** restrikcijske endonukleaze.

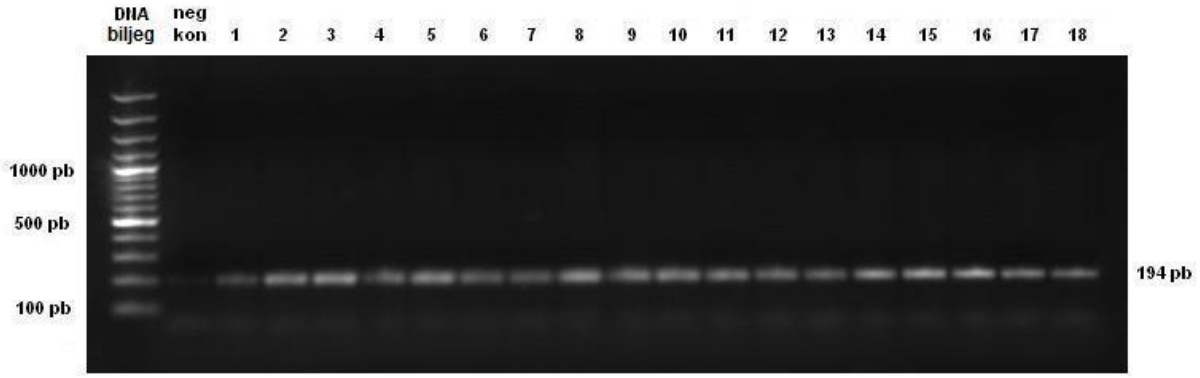
U promotorskoj regiji *MMP9* gena javljaju se uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ čija dužina, odnosno broj ponavljanja, se može odrediti fragmentarnom analizom na automatskom sekvenceru.

4.2.5.1. Umnožavanje fragmenata DNA koji sadrže polimorfna mjesta PCR metodom

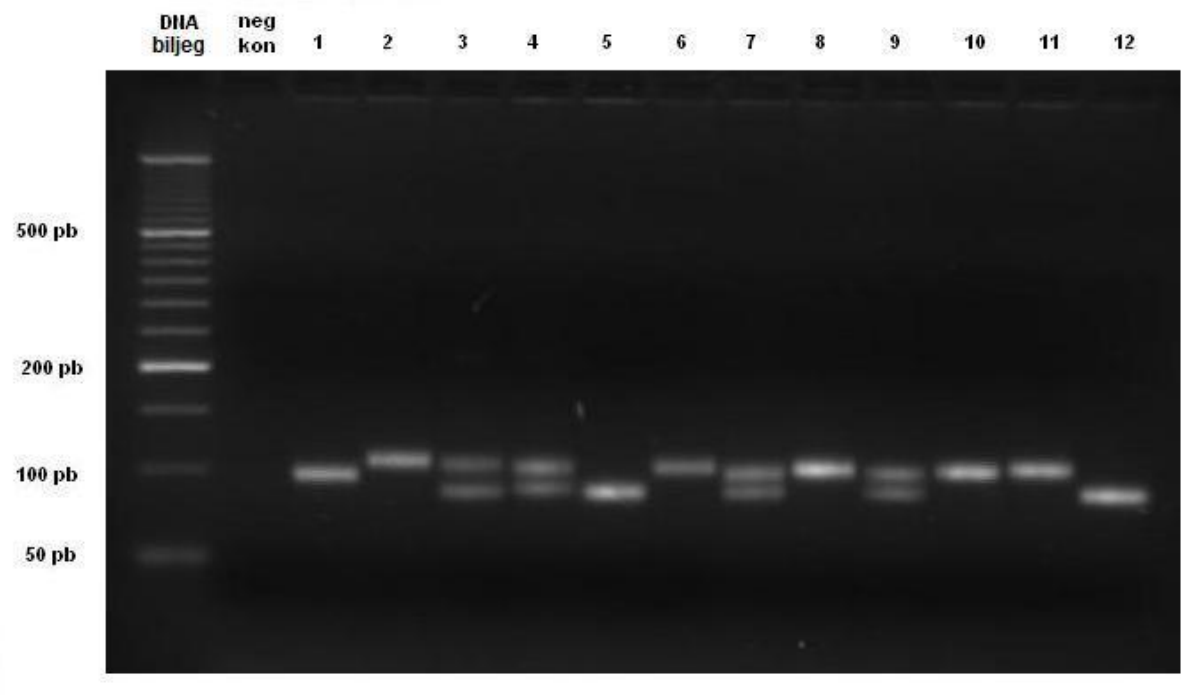
Uspješnost umnožavanja fragmenata DNA PCR reakcijom provjerena je elektroforezom u agaroznom gelu. Veličina fragmenta DNA za **-1562 C/T** polimorfizam umnoženih s odgovarajućim parom početnica je 435 pb (slika 4.30.), za **Q279R** polimorfizam je 194 pb (slika 4.31.), dok za **uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$** ovisi o broju ponavljanja (slika 4.32.).



Slika 4.30. Kontrolna elektroforeza (1,5 %-tni agarozni gel) fragmenata DNA umnoženih PCR reakcijom uz korištenje para početnica za **-1562 C/T** polimorfizam. DNA biljeg = O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); neg kon = negativna kontrola; linije 1-18 = umnoženi fragmenti DNA veličine 435 pb.



Slika 4.31. Kontrolna elektroforeza (1,5 %-tni agarozni gel) fragmenata DNA umnoženih PCR reakcijom uz korištenje para početnica za **Q279R** polimorfizam. DNA biljeg = O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); neg kon = negativna kontrola; linije 1-18 = umnoženi fragmenti DNA veličine 194 pb.



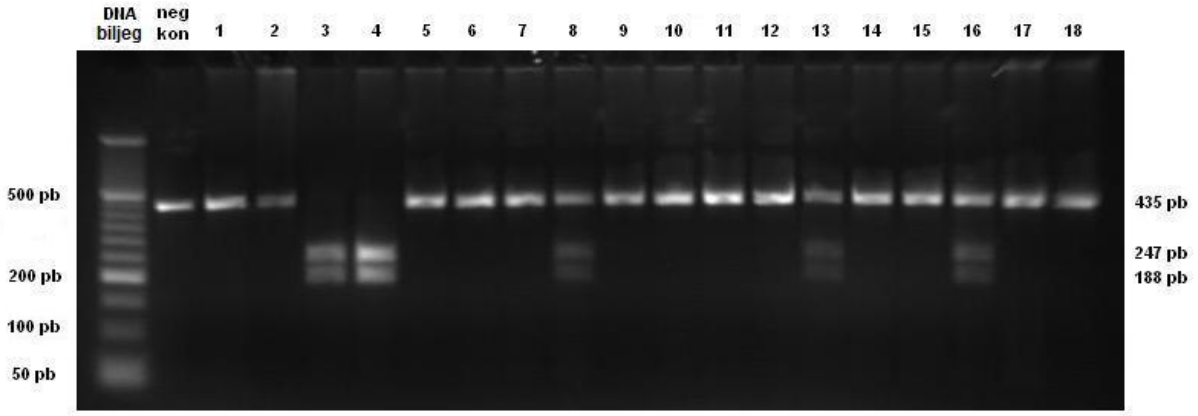
Slika 4.32. Kontrolna elektroforeza (4 %-tni agarozni gel) fragmenata DNA umnoženih PCR reakcijom uz korištenje para početnica za **uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$**. DNA biljeg = O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); neg kon = negativna kontrola; linije 1-12 = umnoženi fragmenti DNA veličine između 78 i 98 pb.

4.2.5.2. Određivanje genotipova RFLP metodom

Produkti kidanja fragmenata DNA nakon djelovanja restrikcijskih enzima razdvojeni su elektroforezom u 3 %-tnom agaroznom gelu za **-1562 C/T** polimorfizam, odnosno u 4 %-tnom agaroznom gelu za **Q279R** polimorfizam. Na temelju veličine razdvojenih fragmenata određeni su genotipovi za svaki pojedini ispitivani polimorfizam.

Kod određivanja **-1562 C/T** polimorfizma u promotorskoj regiji *MMP9* gena:

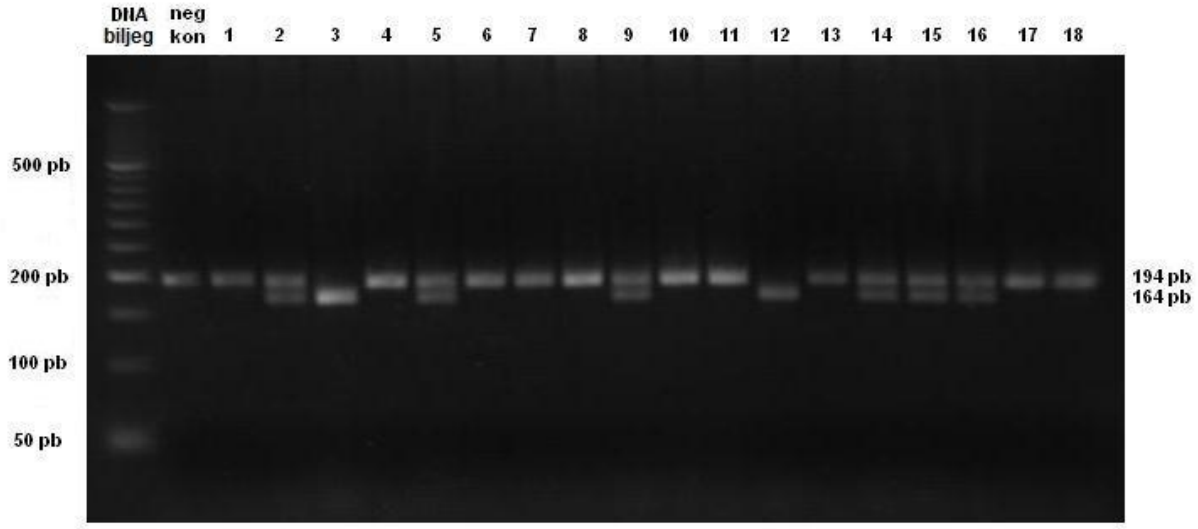
- homozigoti za C alel (**genotip CC**) imaju nepokidani fragment od 435 pb,
- homozigoti za T alel (**genotip TT**) imaju pokidane fragmente od 188 i 247 pb,
- heterozigoti (**genotip CT**) imaju nepokidani fragment od 435 pb i pokidane fragmente od 188 i 247 pb (slika 4.33.).



Slika 4.33. Elektroforeza produkata kidanja restrikcijskim enzimom **SphI** u 3 %-tnom agaroznom gelu. DNA biljeg = O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); neg kon = negativna kontrola; linije 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17 i 18 = CC genotip; linije 8, 13 i 16 = CT genotip; linije 3 i 4 = TT genotip.

Kod određivanja **Q279R** polimorfizma u egzonu 6 *MMP9* gena:

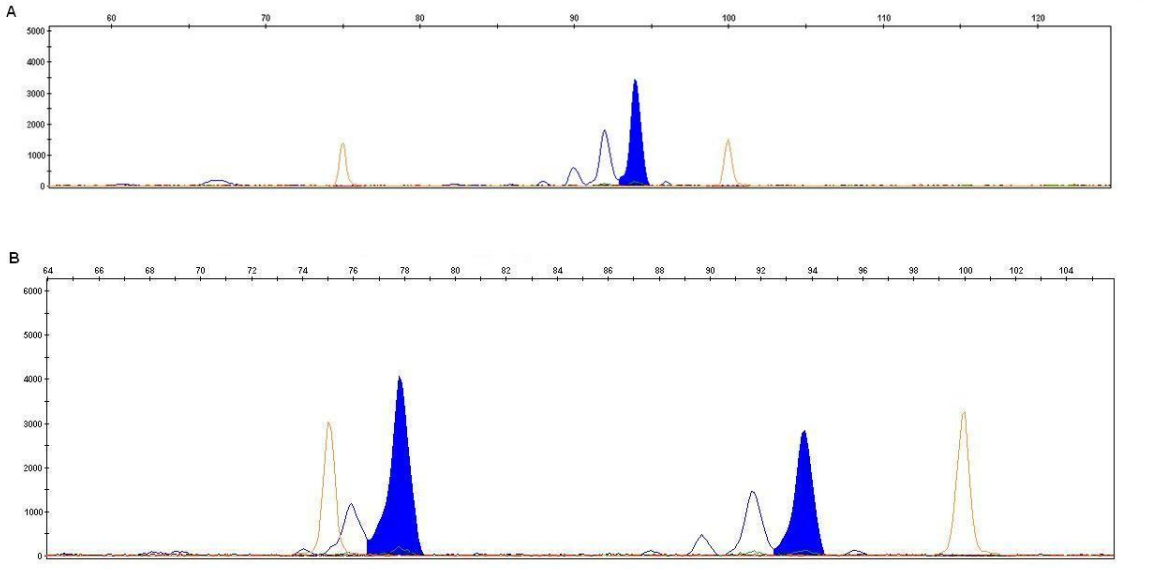
- homozigoti za A alel (**genotip AA**) imaju nepokidani fragment od 194 pb,
- homozigoti za G alel (**genotip GG**) imaju pokidane fragmente od 30 i 164 pb,
- heterozigoti (**genotip AG**) imaju nepokidani fragment od 194 pb i pokidane fragmente od 30 i 164 pb (slika 4.34.).



Slika 4.34. Elektroforeza produkata kidanja restrikcijskim enzimom **SmaI** u 4 %-tnom agaroznom gelu. DNA biljeg = O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); neg kon = negativna kontrola; linije 1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 17 i 18 = AA genotip, linije 2, 5, 9, 14, 15 i 16 = AG genotip; linije 3 i 12 = GG genotip.

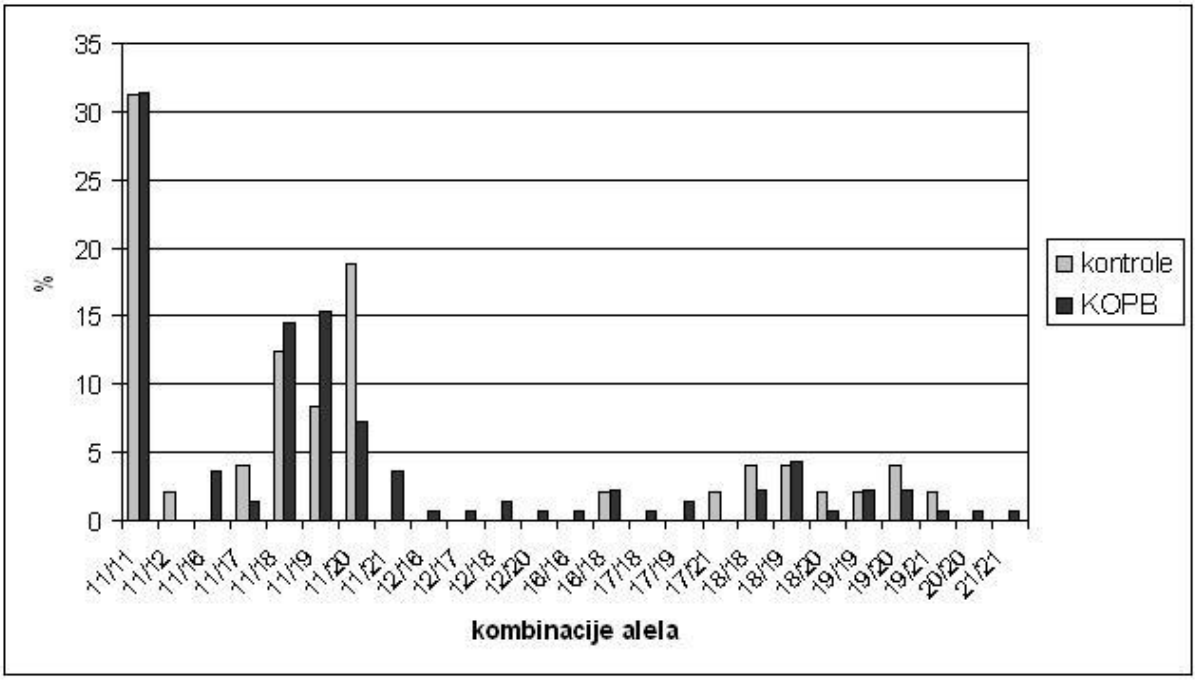
4.2.5.3. Određivanje genotipova metodom fragmentarne analize na automatskom sekvenceru

Broj uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ u promotorskoj regiji *MMP9* gena određen je računski nakon provedene fragmentarne analize na automatskom sekvenceru (slika 4.35.).



Slika 4.35. Primjeri rezultata fragmentarne analize na automatskom sekvenceru: A) homozigot s umnoženim fragmentima DNA duljine 94 pb što odgovara alelima s 19 uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$; B) heterozigot s umnoženim fragmentima DNA duljine 78 i 94 pb što odgovara alelima s 11 i 19 uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$.

Broj uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ u pojedinim alelima svih ispitanika varirao je od 11 do 21 (slika 4.36.).



Slika 4.36. Kombinacije alela prema broju uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ (od 11 do 21) u ispitivanim skupinama.

S obzirom na bimodalnu raspodjelu, aleli su podijeljeni u dvije skupine:

- kratki (eng. *short*, **S**) - aleli s 12 ili manje uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$,
- dugi (eng. *long*, **L**) - aleli sa 16 ili više uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$.

Prema ovoj podjeli određeni su genotipovi za **uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$** u promotorskoj regiji *MMP9* gena :

- homozigoti (**genotip SS**) imaju oba alela s 12 ili manje uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$,
- homozigoti (**genotip LL**) imaju oba alela sa 16 ili više uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$,
- heterozigoti (**genotip SL**) imaju jedan alel s 12 ili manje i jedan alel sa 16 ili više uzastopnih ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$.

4.2.5.4. Učestalost genotipova *MMP9* gena u ispitivanim skupinama

Učestalosti ispitivanih genotipova *MMP9* gena u skupini zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om prikazane su u tablici 4.9.

Tablica 4.9. Učestalosti ispitivanih genotipova *MMP9* gena u skupini zdravih ispitanika (N=48) i bolesnika s KOPB-om (N=137).

polimorfizam	genotip	kontrole		KOPB		P
		N	%	N	%	
-1562 C/T	**CC**	36	75,0	106	77,4	0,199
	CT	11	22,9	27	19,7	
	TT	1	2,1	4	2,9	
uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$	**SS**	16	33,3	43	31,4	0,199
	SL	21	43,8	68	49,6	
	LL	11	22,9	26	19,0	
Q279R	**AA**	20	41,6	61	44,5	0,199
	AG	21	43,8	58	42,3	
	GG	7	14,6	18	13,2	

Fisherov egzaktni test; rezultati su prikazani kao broj (N) i postotak (%) ispitanika s određenim genotipom.

Najučestaliji genotipovi u skupini zdravih ispitanika su CC (75,0 %) za -1562 C/T polimorfizam, SL (43,8 %) za uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ te AG (43,8 %) za Q279R polimorfizam. U skupini bolesnika s KOPB-om najučestaliji genotipovi su CC (77,4 %) za -1562 C/T polimorfizam, SL (49,6 %) za uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ te AA (44,5 %) za Q279R polimorfizam. Međutim, nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova niti za jedan od ispitivanih polimorfizama *MMP9* gena.

4.2.5.5. Učestalost alela *MMP9* gena u ispitivanim skupinama

Učestalosti ispitivanih alela *MMP9* gena u skupini zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om prikazane su u tablici 4.10.

Najučestaliji aleli u skupini zdravih ispitanika su C (86,5 %) za -1562 C/T polimorfizam, S (55,2 %) za uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ te A (63,5 %) za Q279R polimorfizam. U skupini bolesnika s KOPB-om najučestaliji aleli su također C (87,2 %) za -1562 C/T polimorfizam, S (56,2 %) za uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$ te A (65,7 %) za Q279R polimorfizam. Isto kao i kod genotipova, nije pronađena statistički značajna razlika u učestalosti alela niti za jedan od ispitivanih polimorfizama *MMP9* gena.

Tablica 4.10. Učestalosti ispitivanih alela *MMP9* gena u skupini zdravih ispitanika (N=48) i bolesnika s KOPB-om (N=137).

polimorfizam	alel	kontrole		KOPB		P
		N	%	N	%	
-1562 C/T	**C**	83	86,5	239	87,2	1,000
	T	13	13,5	35	12,8	
uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$	**S**	53	55,2	154	56,2	1,000
	L	43	44,8	120	43,8	
Q279R	**A**	61	63,5	180	65,7	1,000
	G	35	36,5	94	34,3	

χ^2 test; rezultati su prikazani kao broj (N) i postotak (%) ispitanika s određenim alelom.

4.2.5.6. Koncentracija MMP-9 u plazmi ispitanika i genotipovi *MMP9* gena

Koncentracija MMP-9 u plazmi zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om za pojedine genotipove *MMP9* gena prikazana je u tablici 4.11. Zbog male učestalosti TT genotipa kod polimorfizma -1562 C/T, ispitanici s CT i TT genotipom su svrstani u jednu podskupinu.

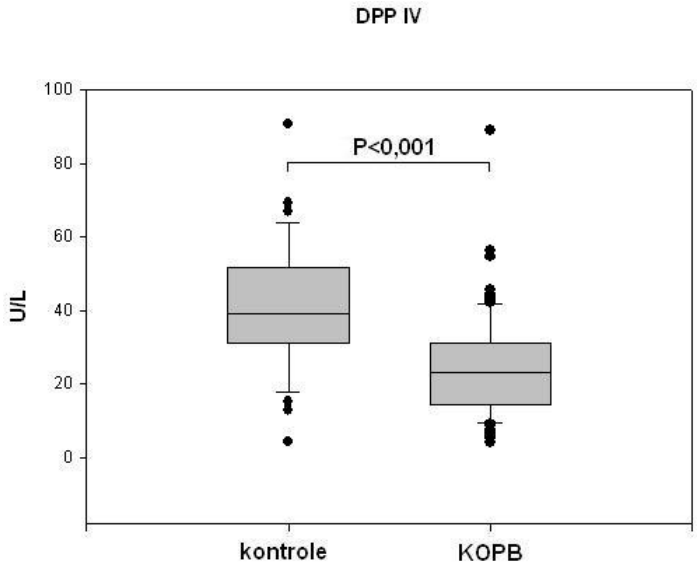
Tablica 4.11. Koncentracija MMP-9 i genotipovi *MMP9* gena u skupini zdravih ispitanika (N=20) i bolesnika s KOPB-om (N=59). Rezultati su prikazani kao broj ispitanika (N) i medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila). P* označava statističku značajnost u koncentraciji MMP-9 između genotipova u skupini zdravih ispitanika i u skupini bolesnika s KOPB-om, dok P** označava statističku značajnost u koncentraciji MMP-9 između skupine zdravih ispitanika i skupine bolesnika s KOPB-om istog genotipa.

	kontrole		KOPB		P**
	N	MMP-9 (ng/mL)	N	MMP-9 (ng/mL)	
-1562 C/T polimorfizam					
CC	17	77 (52 - 121)	46	217 (115 - 344)	<0,001
CT + TT	3	55 (48 - 79)	13	191 (121 - 397)	0,031
P*		0,341		0,862	
uzastopna ponavljanja dinukleotida $(CA)_n$					
SS	6	70 (55 - 134)	19	207 (116 - 351)	0,008
SL	9	64 (46 - 105)	30	196 (121 - 285)	<0,001
LL	5	88 (77 - 110)	10	246 (68 - 424)	0,298
P*		0,742		0,955	
Q279R polimorfizam					
AA	9	70 (52 - 137)	27	207 (116 - 351)	0,002
AG	8	59 (45 - 89)	27	201 (128 - 364)	<0,001
GG	3	88 (88 - 95)	5	86 (64 - 283)	0,786
P*		0,431		0,287	

Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji MMP-9 ovisno o genotipu *MMP9* gena (za sva tri ispitana polimorfizma) ni u skupini zdravih ispitanika niti u skupini bolesnika s KOPB-om. Statistički značajno veće koncentracije MMP-9 nađene su u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na skupinu zdravih ispitanika CC genotipa (P<0,001) i CT + TT genotipova (P=0,031), kao i u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na skupinu zdravih ispitanika SS genotipa (P=0,008) i SL genotipa (P<0,001) te u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na skupinu zdravih ispitanika AA genotipa (P=0,002) i AG genotipa (P<0,001). Zanimljivo je da nismo pronašli statistički značajne razlike u koncentraciji MMP-9 u skupini bolesnika s KOPB-om u odnosu na skupinu zdravih ispitanika LL genotipa (P=0,298) i GG genotipa (P=0,786).

4.2.6. Dijagnostička vrijednost određivanja katalitičke aktivnosti DPPIV u serumu

U serumu ispitanika određena je katalitička aktivnost DPPIV (slika 4.37.). Pronađena je statistički značajno manja aktivnost DPPIV u serumu bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave ispitanike (P<0,001) (Somborac Bačura i sur., 2012).



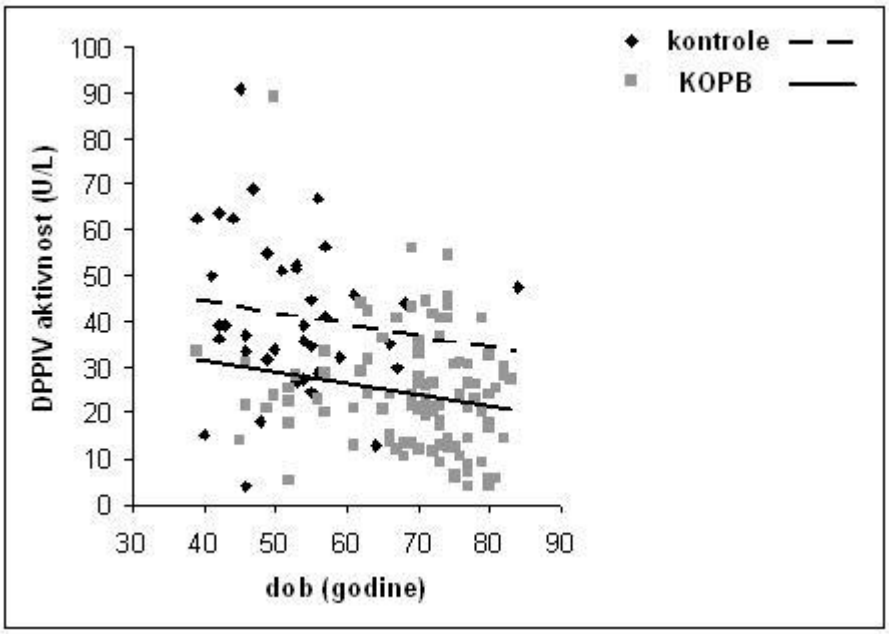
Slika 4.37. Grafički prikaz katalitičke aktivnosti DPPIV u serumu zdravih ispitanika (N=38) i bolesnika s KOPB-om (N=106). Za statistički značajnu razliku uzeta je vrijednost P<0,05 (prema Somborac Bačura i sur., 2012).

Tablica 4.12. Katalitička aktivnost DPPIV u serumu zdravih ispitanika (N=38) i bolesnika s KOPB-om (N=106) podijeljenih u podskupine prema GOLD-u. Rezultati su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon između prvog i trećeg kvartila). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrole označene su s * P<0,001 (prema Somborac Bačura i sur., 2012).

	DPPIV (U/L)
kontrole	39,01 (31,68 - 51,45)
KOPB	23,05 (14,41 - 31,02)*
GOLD 2	20,91 (17,22 - 26,99)*
GOLD 3	23,68 (13,72 - 33,84)*
GOLD 4	25,32 (14,28 - 31,60)*

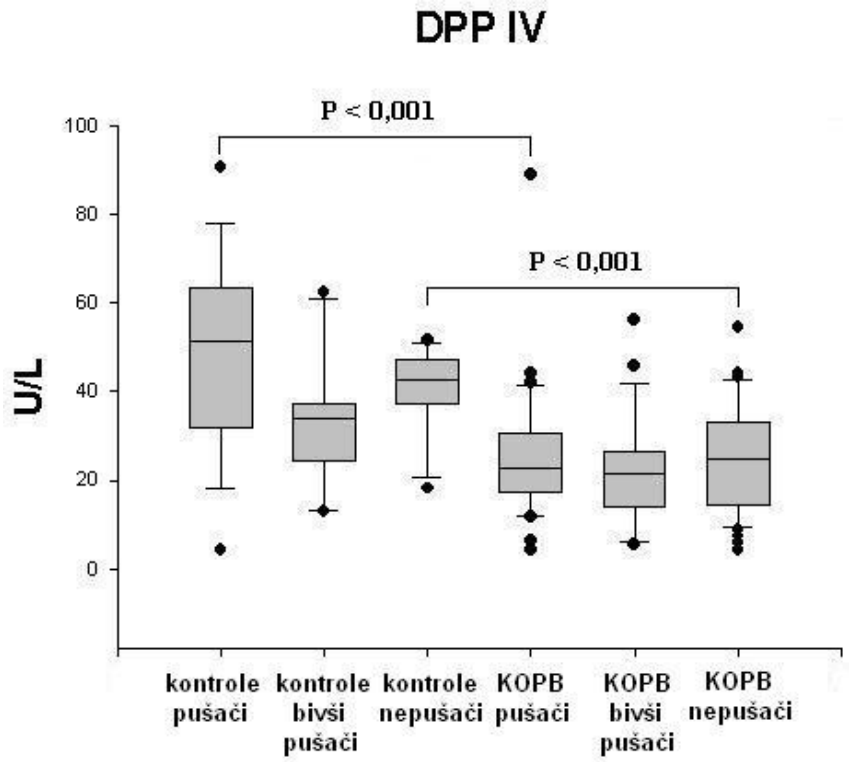
Između podskupina bolesnika s KOPB-om (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4) nisu pronađene statistički značajne razlike u aktivnosti DPPIV. Ipak, u svim podskupinama aktivnost DPPIV je bila statistički značajno manja nego u zdravih ispitanika (P<0,001) (tablica 4.12.) (Somborac Bačura i sur., 2012).

S obzirom da je skupina bolesnika s KOPB-om bila značajno starija u odnosu na zdrave ispitanike (tablica 4.2), ispitali smo mogući utjecaj dobi na aktivnost DPPIV. Linearna regresijska analiza pokazala je da nema korelacija između aktivnosti DPPIV i dobi ni u zdravih ispitanika (r = -0,158, P=0,342) niti u bolesnika s KOPB-om (r = -0,175, P=0,073) (slika 4.38.), ukazujući na to da dob ne utječe na aktivnost DPPIV (Somborac Bačura i sur., 2012).



Slika 4.38. Grafički prikaz korelacije između katalitičke aktivnosti DPPIV u serumu i dobi u zdravih ispitanika (r = -0,158, P=0,342) i u bolesnika s KOPB-om (r = -0,175, P=0,073).

Ispitivanje utjecaja pušenja na aktivnost DPPIV u serumu prikazano je na slici 4.39. Ni u skupini zdravih ispitanika niti u skupini bolesnika s KOPB-om nisu pronađene statistički značajne razlike između pušača, bivših pušača i nepušača (P>0,05). Međutim, pronađene su statistički značajno manje aktivnosti DPPIV u bolesnika s KOPB-om pušača i nepušača u odnosu na zdrave ispitanike pušače i nepušače (P<0,001) (Somborac Bačura i sur., 2012).

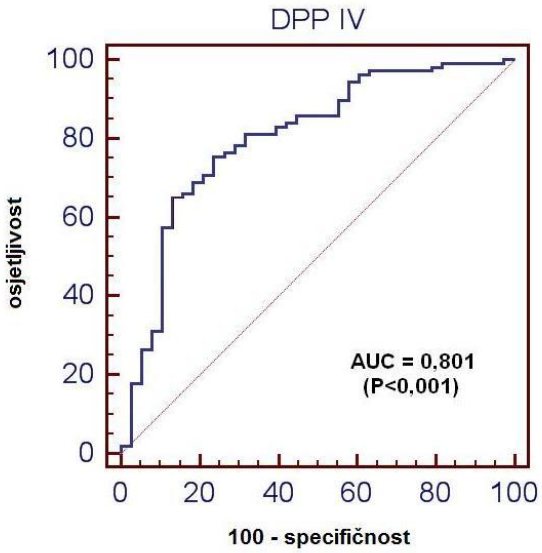


Slika 4.39. Grafički prikaz katalitičke aktivnosti DPPIV u serumu zdravih ispitanika (N=38) i bolesnika s KOPB-om (N=106) podijeljenih prema pušačkom statusu. Za statistički značajnu razliku uzeta je vrijednost P<0,05 (prema Somborac Bačura i sur., 2012).

Analizom ROC krivulje za aktivnost DPPIV ispitali smo dijagnostičku točnost ovog parametra (tablica 4.13. i slika 4.40.) (Somborac Bačura i sur., 2012). Rezultati su pokazali vrlo dobru dijagnostičku točnost za aktivnost DPPIV (AUC = 0,801; 95 % interval pouzdanosti = 0,727 - 0,863; P<0,001). Na temelju ovih rezultata možemo predložiti optimalnu graničnu vrijednost aktivnosti DPPIV za razlikovanje zdravih od bolesnih. Za aktivnost DPPIV vrijedi da ukoliko je manja od ili jednaka 26,72 U/L vjerojatnije se radi o bolesnoj osobi (osjetljivost = 65 %), a ukoliko je veća od 26,72 U/L vjerojatnije se radi o zdravoj osobi (specifičnost = 87 %).

Tablica 4.13. Dijagnostička točnost ispitana analizom ROC krivulje za aktivnost DPPIV u serumu (prema Somborac Bačura i sur., 2012).

	AUC	**95 % interval pouzdanosti**	**P**	**osjetljivost (%)**	**specifičnost (%)**	**optimalna granična vrijednost**
DPPIV	0,801	0,727 - 0,863	<0,001	65	87	≤26,72 U/L



Slika 4.40. ROC krivulja za katalitičku aktivnost DPPIV (prema Somborac Bačura i sur., 2012).

Univarijatna logistička regresijska analiza aktivnosti DPPIV i biljega upale pokazala je da su aktivnost DPPIV, koncentracija ukupnih leukocita, segmentiranih neutrofila, limfocita i CRP-a dijagnostički prediktori KOPB-a (P<0,05). Multivarijatnom logističkom regresijskom analizom pokazali smo da model koji uključuje aktivnost DPPIV, udio limfocita u krvi i koncentraciju CRP-a kasificira ova tri parametra kao neovisne prediktore bolesti, povećavajući dijagnostičku točnost (AUC = 0,933; 95 % interval pouzdanosti = 0,879 - 0,968; P<0,05) (tablica 4.14.; Somborac Bačura i sur., 2012).

Tablica 4.14. Univarijatna i multivarijatna logistička regresijska analiza aktivnosti DPPIV i biljega upale. Za statistički značajne razlike uzete su vrijednosti kod kojih je P<0,05 (prema Somborac Bačura i sur., 2012).

	univarijatna		**multivarijatna**	
	omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	**P**	**omjer izgleda** (95 % interval pouzdanosti)	**P**
DPPIV aktivnost	0,9272 (0,8985 - 0,9569)	0,0000	0,9571 (0,9247 - 0,9906)	0,0125
ukupni leukociti	1,5877 (1,2985 - 1,9414)	0,0000	-	-
segmentirani neutrofili	1,0798 (1,0408 - 1,1204)	0,0000	-	-
monociti	0,8703 (0,7437 - 1,0184)	0,0832	-	-
limfociti	0,8703 (0,8258 - 0,9173)	0,0000	0,8916 (0,8378 - 0,9489)	0,0003
CRP	1,1411 (1,0504 - 1,2398)	0,0018	1,1068 (1,0097 - 1,2131)	0,0302

5. RASPRAVA

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB), kao jedan od vodećih uzroka smrti, predstavlja značajan zdravstveni problem u svijetu. Učestalost bolesti je u stalnom porastu, te postoji potreba za bržim prepoznavanjem i postavljanjem dijagnoze kod oboljelih, što ujedno podrazumijeva i bolje poznavanje same patogeneze bolesti. Posljednjih desetljeća mnogobrojna istraživanja doprinijela su razumijevanju epidemiologije i patofiziologije bolesti; međutim, mehanizmi koji dovode do razvoja bolesti još su uvijek prilično nejasni.

5.1. *IN VITRO* MODEL ZA KOPB

Glavni etiološki čimbenik za razvoj KOPB-a je pušenje cigareta. Dim cigareta je smjesa brojnih oksidansa i reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, te u plućima izaziva oksidacijski stres i upalni odgovor koji aktivira alveolarne makrofage, privlači neutrofile i potiče ih na otpuštanje različitih proteaza. Oštećenja uzrokovana oksidacijskim stresom ili unutarstaničnim odgovorom na stres vode do stanične smrti strukturnih stanica pluća (alveolarnih epitelnih i endotelnih stanica, a moguće i fibroblasta). Nadalje, aktivirane proteaze razgrađuju komponente izvanstaničnog matriksa, te tako pridonose razaranju plućnog tkiva. Ipak, način na koji dim cigareta oštećuje pluća i dalje ostaje nedovoljno istražen.

Kako bi se detaljnije ispitali patofiziološki mehanizmi pušenjem uzrokovanih bolesti, razvijeni su različiti *in vitro*, životinjski i ljudski modeli na kojima se testiraju akutni učinci dima cigareta i stanični odgovori. Ispitivanje akutnog odgovora na izloženost dimu cigareta važno je zbog otkrivanja promjena koje bi mogle biti prvi koraci u razvoju KOPB-a. Poznavanje ovih učinaka je potrebno jer višekratni akutni učinci dima cigareta mogu biti podloga kasnijem kroničnom odgovoru (van der Vaart i sur., 2004). Zlatni standard za istraživanje bioloških promjena epitela dišnog sustava su primarne stanice uzgajane dijelom na tekućoj podlozi, a dijelom izložene zraku (eng. *air-liquid interface*), ali mnogo možemo naučiti i iz jednostavnijih sustava, kao što su stanične linije koje je lako uzgajati zbog njihove sposobnosti neograničene proliferacije (Shapiro, 2004). Jedna od staničnih linija koja se učestalo koristi kao *in vitro* model za pušenjem uzrokovane bolesti je A549 linija ljudskih alveolarnih epitelnih stanica tipa II (Li i sur., 2013). Metode izlaganja dimu cigareta se uvelike razlikuju, od korištenja ekstrakta ili kondenzata dima cigareta pa do izravnog izlaganja dimu cigareta, uz dodatne razlike u broju korištenih cigareta (s ili bez filtera) i vremenskom trajanju izloženosti. S obzirom da se ekstrakt dima cigareta po sastavu razlikuje

od cjelovitog dima cigareta, preporuča se izvoditi pokuse s različitim koncentracijama dima i u različitim vremenima, kako bi se mogli donijeti grubi zaključci o tome što se događa *in vivo* u plućima pušača (Shapiro, 2004). Tako je jedna od prednosti izravnog izlaganja dimu cigareta, u odnosu na korištenje ekstrakta dima cigareta, izravna raspodjela dima iznad stanične kulture, što više nalikuje procesu inhalacije dima cigareta u pluća i njegovoj raspodjeli iznad površine dišnog sustava tijekom pušenja (Somborac Bačura i sur., 2013). Ipak, *in vitro* eksperimenti ne mogu u potpunosti dočarati sve uvjete mikrookoliša koji postoje u živom organizmu, poput sloja sluzi (Shapiro, 2004). Nadalje, o samoj kvaliteti pripreme ekstrakta dima cigareta ovisi njegov sastav jer se gube hlapljive i lako reaktivne komponente, dok se čestice zadržavaju, zbog čega je i sama standardizacija postupka problematična (Rennard, 2004). Iz tog razloga smo mi tijekom pripreme ekstrakata dima cigareta za naše eksperimente koristili samo svježe pripremljene otopine čija apsorbancija na 320 nm je odgovarala standardnim vrijednostima prikazanim u tablici 4.1. Preporuka je da se ekstrakti dima cigareta pripremaju neposredno prije same upotrebe jer im se stajanjem ili pohranom mijenja kemijski sastav (Rennard, 2004). U konačnici, bez obzira na poznate nedostatke, *in vitro* istraživanja ostaju korisni modeli za proučavanje učinaka dima cigareta.

5.2. RAZVOJ APOPTOZE I NEKROZE POD UTJECAJEM DIMA CIGARETA

Tijekom ovog istraživanja, citotoksični učinak ekstrakta dima cigareta na ljudske alveolarne epitelne stanice linije A549 ispitan je upotrebom različitih testova. Rezultati ispitivanja vijabilnosti stanica MTT testom pokazali su da kraća inkubacija (tijekom 4 h) s ekstraktom dima cigareta koncentracija 10 % i 20 % uzrokuje blago povećanje vijabilnosti A549 stanica kao i niska koncentracija ekstrakta dima cigareta od 1,25 % nakon 24-satne inkubacije. Veća koncentracija ekstrakta dima cigareta (20 %) nakon 24-satne inkubacije uzrokuje značajno smanjenje vijabilnosti A549 stanica. Međutim, nakon 48-satne inkubacije sve koncentracije dima cigareta dovele su do značajnog smanjenja vijabilnosti A549 stanica (slika 4.2.). Mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad A549 stanica tretiranih ekstraktom dima cigareta pokazali smo da nakon 24-satne inkubacije dolazi do povećanog umiranja stanica tretiranih s koncentracijom dima od 20 % (slika 4.3.). Bojanjem stanica aneksinom V i propidijevim jodidom te analizom na protočnom citometru dokazali smo da nakon 4-satne inkubacije veće koncentracije dima (5 %, 10 % i 20 %) dovode do povećanja broja stanica u ranoj apoptozi. Međutim, nakon 24-satne inkubacije dolazi do značajnog smanjenja broja živih stanica (10 % i 20 % ekstrakt dima cigareta) i stanica u ranoj apoptozi

(1,25 %, 2,5 %, 5 % i 20 % ekstrakt dima cigareta) te povećanja broja nekroznih stanica pri najvećim koncentracijama dima od 10 % i 20 % (slika 4.4.). Ovi rezultati nam govore da dim cigareta izaziva umiranje epitelnih stanica na način da viša koncentracija i duže vrijeme izloženosti stanica dimu dovode do znatnijih oštećenja u stanicama, što vodi stanice u nekrozni oblik stanične smrti. Navedeni rezultati u skladu su s prethodno objavljenim istraživanjima. Kaushik i suradnici (2008) su zaključili da kondenzat dima cigareta u niskim koncentracijama izaziva proliferaciju A549 stanica, dok veće koncentracije i duža izloženost smanjuju vijabilnost stanica uzrokujući apoptozu. Mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH otpuštene u medij iznad A549 stanica Li i suradnici (2013) su pokazali da čestice iz dima cigareta ne djeluju citotoksično nakon kraćeg izlaganja (3 h), već nakon 24-satne inkubacije. Hoshino i suradnici (2001) su MTT testom pokazali smanjenu vijabilnost A549 stanica pod utjecajem ekstrakta dima cigareta te da koncentracije dima do 5 % izazivaju apoptozu, dok koncentracije veće od 10 % vode stanice u nekrozu. Izlaganjem A549 i Jurkat stanica kondenzatu dima cigareta Wickenden i suradnici (2003) su dokazali da dim cigareta sprečava apoptozu putem inhibicije aktivacije kaspaza, te izaziva nekrozu. Suprotno ovim rezultatima, Ramage i suradnici (2006) te Jiao i suradnici (2006) su koristeći različite tehnike pokazali da dim cigareta izaziva apoptozu u A549 stanicama. Konačno, van der Toorn i suradnici (2007a) su pronašli da ekstrakt dima cigareta inhibicijom aktivnosti kompleksa I i II u transportnom lancu elektrona i smanjenjem potencijala mitohondrijske membrane ometa normalnu funkciju mitohondrija u A549 stanicama, umanjujući tako sposobnost mitohondrija da sintetiziraju ATP, što sprečava apoptozu i vodi stanice u nekrozu. U BEAS-2B bronhijalnim epitelnim stanicama također je pokazano da ekstrakt dima cigareta najprije i pri nižim koncentracijama izaziva apoptozu, a duljim izlaganjem i pri većim koncentracijama dima u stanicama se potiče nekroza (Slebos i sur., 2007). Možemo zaključiti da bi nekrozna stanična smrt, a ne apoptozna, izazvana dimom cigareta mogla biti glavni uzrok gubitka alveolarnih struktura kod oboljelih od KOPB-a.

5.3. OKSIDACIJSKA OŠTEĆENJA UZROKOVANA DIMOM CIGARETA

Dim cigareta uzrokuje oksidacijska oštećenja različitih staničnih struktura, poput lipida i proteina. Mi smo dokazali da izlaganjem A549 stanica ekstraktu dima cigareta dolazi do značajnog povećanja koncentracije MDA u stanicama ovisno o koncentraciji dima (slika 4.5.). Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje koje pokazuje promjene u koncentraciji MDA u A549 alveolarnim epitelnim stanicama izloženim dimu cigareta. Nedavna istraživanja

na miševima izloženim dimu cigareta pokazala su prisustvo povećane koncentracije MDA u homogenatima pluća (Rueff-Barroso i sur., 2010; McCaskill i sur., 2011). Bamonti i suradnici (2006) te Isik i suradnici (2007) su pronašli povećanu koncentraciju MDA u plazmi / serumu pušača u odnosu na nepušače. Štoviše, 30-dnevna nadopuna prehrane s koncentratom voća i povrća pokazala je normalizaciju koncentracije MDA, što upućuje na povoljan utjecaj voća i povrća (bogatih antioksidansima) na oksidacijski status pušača (Bamonti i sur., 2006). Kod oboljelih od KOPB-a utvđeno je da se koncentracija MDA u serumu povećava s težinom bolesti i obrnuto korelira s FEV_1 (Kluchová i sur., 2007). Naše istraživanje ukazuje na to da bi povećana koncentracija MDA mogla biti produkt razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina iz staničnih membrana alveolarnih epitelnih stanica oštećenih dimom cigareta.

Nadalje, u ovom radu pokazali smo da ekstrakt dima cigareta vodi do značajnog sniženja koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina u A549 stanicama ovisno o koncentraciji dima (slika 4.6.). Slične rezultate na A549 stanicama izloženim izravnom djelovanju dima cigareta objavili su van der Toorn i suradnici (2007b, 2009). Štoviše, pokazali su da se uklanjanjem ROS iz dima cigareta taj pad koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina usporava (van der Toorn i sur., 2009). Osim sniženja slobodnih tiolnih skupina proteina pokazali su i da dim cigareta uzrokuje sniženje ukupnog glutationa (GSH + GSSG) u A549 stanicama tako što ne oksidira GSH u GSSG, već ga ireverzibilno veže na aldehide (akrolein, krotonaldehid i jedan nepoznate strukture) koji nastaju gorenjem dima cigareta (van der Toorn i suradnici (2007b). Oksidacijska oštećenja u obliku oksidiranih slobodnih tiolnih skupina proteina pokazana su i na fibroblastima iz desni ljudi izloženih dimu cigareta (Colombo i sur., 2012). Na skupini hemodijaliziranih bolesnika ispitan je utjecaj pušenja na oksidacijski status te je kod pušača nađena snižena koncentracija slobodnih tiolnih skupina proteina u plazmi u odnosu na nepušače (Wang i sur., 2002). *In vitro* eksperiment na ljudskoj plazmi izloženoj dimu cigareta pokazao je da s povećanjem koncentracije dima dolazi do sniženja koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina (Frei i sur., 1991). Zanimljivo je da je istraživanje na bolesnicima s KOPB-om pokazalo nešto veću razinu ukupnih tiola u plazmi u usporedbi sa zdravim ispitanicima (Santos i sur., 2004). Ipak, smatramo da manji broj slobodnih tiolnih skupina u A549 alveolarnim epitelnim stanicama izloženim dimu cigareta dokazuje oksidacijska oštećenja proteina, što može dovesti do značajnih promjena u staničnom metabolizmu.

Oštećeni proteini u stanicama usmjeravaju se za razgradnju putem proteasoma konjugacijom s molekulama ubikvitina (Hershko & Ciechanover, 1998; Sherman & Goldberg, 2001; Glickman & Ciechanover, 2002). Nedavno su Min i suradnici (2011) prikazali nakupljanje ubikvitiniranih proteina u uzorcima plućnog tkiva bolesnika s KOPB-om, ovisno o težini emfizema. Međutim, nisu prikazali ovisnost rezultata o pušačkom statusu bolesnika. U našem *in vitro* istraživanju uočili smo porast razine ubikvitin-proteinskih konjugata (molekulske mase oko 30 i 35 kDa te onih iznad 150 kDa) u lizatima A549 alveolarnih epitelnih stanica izloženih izravnom djelovanju dimu cigareta (slika 4.7.; prema Somborac Bačura i sur., 2013). Ottenheijm i suradnici (2005) su opisali slične promjene u homogenatima mišića dijafragme bolesnika s KOPB-om. Oni su pronašli dodatne ubikvitin-proteinske konjugate molekulske mase između 75 i 250 kDa i povećanu razinu konjugata veličine oko 30 i 70 kDa. Osim toga, mi smo otkrili da se većina ubikvitiniranih proteina razgradi ukoliko se stanice kultiviraju daljnjih 24 h, što dokazuje da konjugacija s ubikvitinom doprinosi uklanjanju proteina oštećenih dimom cigareta. Ovi rezultati u skladu su s rezultatima koje su nedavno na kulturi A549 stanica izloženih ekstraktu dima cigareta objavili van Rijt i suradnici (2012). Ipak, ostaje nejasno zašto neki ubikvitin-proteinski konjugati (molekulske mase oko 30 i 35 kDa) ostaju prisutni i 24 h nakon izlaganja A549 stanica dimu cigareta (Somborac Bačura i sur., 2013). Moguće objašnjenje je da oksidacijski stres uzrokovan dimom cigareta strukturno promijeni ove specifične proteine na takav način da ih proteasom ne može prepoznati kao supstrate obilježene za proteolizu ili da ih proteasom nije u mogućnosti razmotati. Pretpostavljamo da nakupljanje i povezivanje u agregate takvih ubikvitiniranih proteina u citosolu može dovesti do gubitka važnih funkcija stanice, konačno rezultirajući smrću stanice i pokretanjem upalnog odgovora u plućima pušača, što bi moglo doprinijeti patogenezi KOPB-a.

5.4. DIM CIGARETA IZAZIVA ER STRESNI ODGOVOR I POREMEĆAJ FUNKCIJE PROTEASOMA

Izlaganje stanica različitim stresnim agensima dovodi do nakupljanja krivo smotanih ili razmotanih proteina unutar ER-a, što vodi do ER stresnog odgovora i posljedično stanične smrti (Haynes i sur 2004;. Shore i sur 2011;. Walter & Ron, 2011). Kako bi se ponovno uspostavila homeostaza proteina, putem PERK ogranka UPR-a inhibira se sinteza proteina fosforilacijom eIF2α (Jiang i Wek, 2005;. Jorgensen et al 2008; Todd et al. 2008). Nedavna istraživanja su pokazala da dim cigareta uzrokuje ER stres i potiče UPR odgovor, kako u

kulturi stanica (Hengstermann i Müller, 2008; Jorgensen i sur., 2008;. Kelsen i sur., 2008; Tagawa i sur., 2008; Geraghty i sur., 2011) i životinjskim modelima (Malhotra i sur., 2009; Geraghty i sur., 2011), tako i u plućima pušača (Kelsen i sur., 2008) i bolesnika s KOPB-om (Min i sur., 2011). Hengstermann i Müller (2008) te Geraghty i suradnici (2011) zaključili su da dimom cigareta inducirani ER stres prvenstveno aktivira PERK ogranak UPR-a. U našem radu pokazali smo da dim cigareta povećava razinu fosforiliranog eIF2α ovisno o dozi dima (slika 4.8.; prema Somborac Bačura i sur., 2013), te smanjuje *de novo* sintezu proteina u A549 alveolarnim epitelnim stanicama (slika 4.9.; prema Somborac Bačura i sur., 2013). Sličan učinak ekstrakta dima cigareta na fosforilaciju eIF2α i sintezu proteina u ljudskim endotelnim stanicama umbilikalne vene HUVEC pokazali su Csordas i suradnici (2011), povezujući dugotrajni učinak ER stresa s umiranjem stanica putem autofagije. Smanjena sinteza proteina također je zabilježena u SA 3T3 fibroblastima miša izloženim dimu cigareta (Hengstermann i Müller, 2008) te u plućima štakora izloženih dimu cigareta (Garrett i Jackson, 1980). U plućima bolesnika s emfizemom uzrokovanim nedostatkom α_1-antitripsina nađena je smanjena ekspresija gena uključenih u biosintezu proteina (Golpon i sur., 2004). Naši rezultati pokazuju da dim cigareta aktivira mehanizam koji inhibira translaciju proteina, čime se vjerojatno stanicama daje dodatno vrijeme za oporavak od proteina oštećenih dimom cigareta. Međutim, dugotrajna inhibicija sinteze proteina u alveolarnim epitelnim stanicama uzrokovana dimom cigareta mogla bi doprinijeti neučinkovitom popravku i rezultirati promjenama alveolarnih struktura koje inače nalazimo u plućima bolesnika s KOPB-om.

Poznato je da UPR, osim putem inhibicije sinteze proteina, pokušava ponovno uspostaviti homeostazu proteina usmjeravajući oštećene proteine na razgradnju putem ubikvitin-proteasomalnog sustava (Hoseki i sur., 2010). Naša *in vitro* istraživanja pokazala su da dim cigareta uzrokuje povećanje ukupne koncentracije slobodnih aminokiselina unutar A549 alveolarnih epitelnih stanica, što je u skladu s rezultatima koje su objavili Abello i suradnici (2008). Štoviše, dokazali smo da je porast koncentracije slobodnih aminokiselina rezultat razgradnje proteina putem proteasoma, jer on izostaje ukoliko se proteasomi blokiraju epoksomicinom (slika 4.10.; prema Somborac Bačura i sur., 2013). Dakle, dim cigareta oštećuje proteine, te se u stanicama povećava razina ubikvitin-proteinskih konjugata, što dovodi do njihove razgradnje putem proteasoma, nakon čega slijedi daljnja razgradnja nastalih peptida u slobodne aminokiseline. Pretpostavljamo da se porast koncentracije slobodnih aminokiselina može tumačiti kao posljedica pojačane razgradnje oštećenih proteina

putem proteasoma zajedno sa smanjenom *de novo* sintezom proteina u stanicama izloženim dimu cigareta.

Dokazano je da se umjereno oksidirani proteini vrlo brzo razgrađuju putem ubikvitin-proteasomalnog sustava, ali jako oksidirani umreženi proteini su slabi supstrati za razgradnju i najčešće se nakupljaju u stanici u obliku agregosoma, što dovodi do inhibicije ubikvitin-proteasomalnog sustava (Bence i sur., 2001; Davies, 2001; Shringarpure i Davies, 2002). S obzirom da smo mi u našem radu pokazali da neki ubikvitin-proteinski konjugati ostaju prisutni u A549 stanicama i 24 h nakon izlaganja dimu cigareta, pretpostavili smo da bi nakupljanje takvih proteina oštećenih dimom cigareta moglo imati učinka na aktivnost proteasoma, te smo ispitali utjecaj dima cigareta na same proteasomalne aktivnosti. Sve tri proteasomalne aktivnosti (kaspazna, tripsinska i kimotripsinska) bile su značajno smanjene ovisno o dozi i vemenu izloženosti stanica dimu cigareta (slika 4.12.; prema Somborac Bačura i sur., 2013). Sličan učinak na aktivnosti proteasoma u A549 alvolarnim i 16HBE bronhijalnim epitelnim stanicama izloženim ekstraktu dima cigareta nedavno su objavili van Rijt i suradnici (2012), bez promjena u ekspresiji proteasomalnih podjedinica. U istom istraživanju nađena je i snižena tripsinska aktivnost proteasoma u homogenatu pluća miševa izloženih dimu cigareta, ali bez utjecaja dima na kaspaznu i kimotripsinsku aktivnost proteasoma. Nedavno su Malhotra i sur. (2009) pokazali značajno smanjenje ukupne aktivnosti proteasoma u plućima bolesnika s KOPB-om uzrokovano promjenama u Nrf2 (antioksidacijski transkripcijski faktor) signalnom putu koje dovode do smanjene ekspresije podjedinica proteasoma te su predložili da bi se aktivnost proteasoma mogla ponovno uspostaviti upotrebom aktivatora Nrf2, poput sulforafana. Naša pretpostavka je da bi jedan od mogućih mehanizama odgovornih za inhibiciju proteasoma mogao biti izravna oksidacija podjedinica proteasoma putem rektivnih kisikovih spojeva iz dima cigareta. Kao što je prikazano na slici 4.11. duža izloženost A549 stanica dimu cigareta uzrokovala je smanjeno vezanje inhibitora proteasoma MV151 na aktivna mjesta proteasoma (β1 - kaspazno, β2 - tripsinsko i β5 - kimotripsinsko), što ukazuje na njihovu promijenjenu strukturu. Reinheckel i sur. (1998) su primijetili da je 26S proteasom prilično osjetljiv na oksidacijski stres, dok je 20S proteasom otporniji. Za proteolizu supstrata putem 26S proteasoma, osim poliubikvitinskog lanca, potrebna je i hidroliza ATP-a (Glickman i Ciechanover, 2002). S obzirom da dim cigareta remeti funkciju mitohondrija i tako smanjuje sintezu ATP-a u stanicama (van der Toorn et al. 2007a), možemo pretpostaviti da, ne samo strukturne promjene podjedinica proteasoma, već i manjak ATP-a unutar stanice uzrokovan dimom

cigareta pridonosi smanjenoj aktivnosti proteasoma. Smanjenje aktivnosti proteasoma zbog djelovanja dima cigareta vjerojatno dovodi do nakupljanja ubikvitiniranih oksidacijski promijenjenih proteina, što čini ovu granu UPR-a nedovoljno učinkovitom za ponovno uspostavljanje homeostaze proteina u stanicama. Neučinkoviti proces popravka, koji je dio upalnog odgovora na oštećenja pluća izazvana dimom cigareta, može dovesti do promjena alveolarnih struktura i tkivne disfunkcije karakteristične za KOPB.

5.5. PROMJENE U RAZINI EKSPRESIJE HSP POD UTJECAJEM DIMA CIGARETA

Jedan od staničnih odgovora na stres i nakupljanje oštećenih proteina je i poticanje stvaranja šaperonskih proteina u stanicama kako bi se povećala mogućnost preživljavanja stanica (Srivastava, 2008). U našem radu pokazali smo da inkubacija A549 stanica s ekstraktom dima cigareta u koncentraciji od 20 % tijekom 8 h te u koncentraciji od 10 % i 20 % tijekom 24 h dovodi do porasta ekspresije HSP32 (slike 4.15. i 4.16.). Daljnjom inkubacijom (nakon 48 h) dokazali smo da dolazi i do porasta ekspresije HSP27 u A549 stanicama stimuliranim s 20 % ekstraktom dima cigareta (slika 4.17.). Ekspresija HSP70 nije pokazala statistički značajnu ovisnost o koncentraciji dima u ispitivanim vremenima (slike 4.13. do 4.17.). Prethodna istraživanja su pokazala da dim cigareta povećava ekspresiju HSP32 (HO-1) u SA 3T3 fibroblastima miša (Müller i Gebel, 1994), premonocitnoj staničnoj liniji U937 (Favatier i Polla, 2001), A549 alveolarnim epitelnim stanicama (Fukano i sur., 2006), BEAS-2B bronhijalnim epitelnim stanicama (Slebos i sur., 2007) i plućnim fibroblastima (Baglole i sur., 2008). Štoviše, indukcija HO-1 povezuje se sa stvaranjem hidroksilnih radikala koji snizuju koncentraciju GSH u stanicama (Müller i Gebel, 1994; Baglole i sur., 2008). Signalni put za koji se pokazalo da može dovesti do indukcije HO-1 uključuje AP-1 proteine c-Fos i c-Jun (Baglole i sur., 2008). Nadalje, pokazalo se da transfekcija BEAS-2B bronhijalnih epitelnih stanica s adenovirusnim konstruktom koji sadrži *HO-1* cDNA sprečava umiranje stanica povećavajući u njima razinu ATP-a (Slebos i sur., 2007). Maestrelli i suradnici (2001) su pronašli povećanu ekspresiju HO-1 u alveolarnim prostorima te HO-2 u stijenkama alveola kroničnih pušača u usporedbi s nepušačima, ali nisu našli razlike između zdravih pušača i pušača s blagom KOPB. Međutim, isti autori su na uzorcima pluća bolesnika s teškom KOPB pokazali smanjenu ekspresiju HO-1 u alveolarnim makrofagima i povećan broj pneumocita pozitivnih na HO-2 u odnosu na zdrave pušače (Maestrelli i sur., 2003). Oni smatraju da visoka razina HO-1 znači aktivni mehanizam obrane od utjecaja dima cigareta te da bolesnici

s teškom KOPB imaju smanjenu obranu od oksidacijskog stresa. Zaključili su da bi promjene u ekspresiji HO mogle biti posljedica bolesti. Povećanje konstitutivne HO-2 u stijenkama alveola povezali su s većim brojem pneumocita jer dim cigareta može izazvati proliferaciju stanica i zadebljanje stijenki alveola, karakteristično za tešku KOPB. Slebos i suradnici (2004) su pokazali da je ekspresija HO-1 snižena u alveolarnim makrofagima iz bronhoalveolarnog ispirka bivših pušača s KOPB-om u usporedbi sa zdravim bivšim pušačima, te su zaljučili da pušenje ne utječe izravno na ekspresiju HO-1, već da je HO-1 nedovoljno eksprimirana u bolesnika, moguće zbog genskih polimorfizama. Smatra se da se inducibilnost HO-1 može povezati s prisustvom mikrosatelitnog polimorfizma (broja ponavljanja GT dinukleotida) u promotorskoj regiji gena za HO-1, za koji je pokazano da snizuje ekspresiju HO-1, te tako utječe na podložnost pojedinca da razvije emfizem (Yamada i sur., 2000). Istraživanje koje su proveli Matokanović i suradnici (2012) na hrvatskoj populaciji nije pokazalo povezanost istog polimorfizma HO-1 s nastankom KOPB-a. Međutim, pronašli su povezanost +1267 A/G polimorfizma *HSP70-2* gena i KOPB-a (učestalost G alela i GG genotipa bila je veća u bolesnika s KOPB-om nego u zdravih ispitanika). Istraživanja ekspresije HSP70 u ovisnosti o izloženosti dimu cigareta pokazala su oprečne rezultate. Zhao i suradnici (2005) pronašli su smanjenu ekspresiju HSP70 u glatkim mišićnim stanicama bronha tretiranih s ekstraktom dima cigareta te u limfoctima bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave pušače, dok su Li CJ i suradnici (2007) pokazali da ekstrakt dima cigareta inducira HSP70 u plućnim fibroblastima ovisno o koncentraciji i vremenu, te dovodi do otpuštanja IL-8 u medij iznad stanica. Signalni put za koji su pokazali da dovodi do indukcije HSP70 uključuje kinazu ERK i transkripcijski faktor protein rasta ranog odgovora 1 (eng. *early growth response-1*, EGR-1). Rumora i suradnici (2008b) ispitali su ekspresiju HSP70 i HSP27 u ovisnosti o pušačkom statusu ispitanika i pronašli su smanjenu ekspresiju u leukocitima bolesnika s KOPB-om (pušača i bivših pušača) u odnosu na nepušače s KOPB-om te u zdravih pušača u odnosu na bivše pušače i nepušače. Međutim, Hacker i suradnici (2009) opisali su povećanu razinu istih parametara (HSP70 i HSP27) u serumu bolesnika s KOPB-om. Dakle, većina *in vitro* istraživanja pokazuje povećanje ekspresije različitih HSP u stanicama pod utjecajem dima cigareta, dok istraživanja na uzorcima oboljelih od KOPB-a uglavnom prikazuju smanjenu ekspresiju. Moguće je da u *in vitro* istraživanjima dolazi do prolazne indukcije HSP u stanicama pod utjecajem stresa izazvanog dimom cigareta te da kod osoba kronično izloženih štetnim utjecajima dolazi do iscrpljenja ovog obrambenog mehanizma što bi moglo pridonijeti razvoju bolesti.

5.6. AKTIVACIJA MAPK SIGNALNIH PUTOVA POD UTJECAJEM DIMA CIGARETA

MAPK signalni putovi uključeni su u odgovor stanice na prisustvo različitih vanjskih podražaja, a mogu dovesti do proliferacije stanice, diferencijacije, smrti ili upalnog odgovora (Roux i Blenis, 2004; Rumora i Žanić Grubišić, 2008). U ovom radu pokazali smo da izloženost A549 stanica ekstraktu dima cigareta, neovisno o primijenjenoj koncentraciji i / ili vremenu izloženosti, ne utječe značajno na razinu ekspresije ukupnih ERK, JNK i p38 MAPK, ali različito aktivira pojedine MAPK. Inkubacijom A549 stanica s ekstraktom dima cigareta nije došlo do značajnijih promjena u aktivaciji ERK (slike 4.18. i 4.19.), aktivaciju JNK nismo uspjeli detektirati ni u nestimuliranim stanicama niti u stanicama izloženim ekstraktu dima cigareta (slike 4.20. i 4.21.), ali je ekstrakt dima cigareta izazvao značajan porast razine aktivirane p38 (slike 4.22. i 4.23.). Prethodna istraživanja su pokazala različite odgovore stanica na isloženost dimu cigareta. U normalnim bronhijalnim epitelnim stanicama NHBE tretiranim s kondenzatom dima cigareta zabilježena je aktivacija ERK1/2 ovisna o koncentraciji kondenzata dima cigareta (Hellermann i sur., 2002). U istom istraživanju dokazano je da inhibicija MEK smanjuje fosforilaciju ERK1/2 i ekspresiju IL-1β inducirane kondenzatom dima cigareta. Luppi i suradnici (2005) su pokazali da kondenzat dima cigareta u niskim koncentracijama aktivira ERK1/2 u bronhijalnim epitelnim stanicama linije NCI-H292, dok u višim koncentracijama aktivira pro-apoptozne kinaze p38 i JNK. Istraživanje na ljudskim endotelnim stanicama umbilikalne vene HUVEC pokazalo je da ekstrakt dima cigareta oštećuje stanice aktivacijom JNK signalnog puta (Hoshino i sur., 2005). Nadalje, zabilježena je i povećana razina aktivirane p38 u plućnim fibroblastima izloženim ekstraktu dima cigareta (Kim i sur., 2011). Suprotno ovim istraživanjima, Li W i suradnici (2007) pokazali su da ekstrakt dima cigareta ne aktivira MAPK i ne utječe na otpuštanje IL-8 i faktora koji stimulira rast granulocitno-makrofagnih kolonija (eng. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF) u primarnim epitelnim stanicama dišnih putova. Stoga možemo zaključiti da aktivacija različitih MAPK ovisi o vrsti korištene stanične linije i stimulansa.

Neki istraživači predložili su mehanizam kojim dim cigareta u plućima štakora inducira apoptozu, a to je aktivacija p38/JNK-Jun-FasL signalnog puta (Kuo i sur., 2005; Wu i sur., 2006). Istraživanje na A/J miševima pokazalo je da se korištenjem specifičnog inhibitora kinaze p38α može umanjiti upalni odgovor u plućima izazvan dimom cigareta, što je

dokazano smanjenjem broja makrofaga i neutrofila, razine ciklooksigenaze-2 i IL-6 te ekspresije fosforilirane p38, ukazujući tako na mogućnost upotrebe inhibitora p38 u terapijske svrhe kod KOPB-a (Medicherla i sur., 2008).

Mochida-Nishimura i suradnici (2001) su u svom istraživanju pokazali da alveolarni makrofagi pušača sadrže manje aktivirane p38 kinaze nego alveolarni makrofagi nepušača, a razlika u razini aktiviranih ERK i JNK nije bilo. Međutim, nakon stimulacije alveolarnih makrofaga s LPS-om kod pušača su pronašli bržu aktivaciju p38 nego kod nepušača, dok se aktivacija ERK i JNK nije značajno razlikovala. Rumora i suradnici (2008a) ispitali su aktivaciju MAPK u leukocitima oboljelih od KOPB te zdravih kontrola u ovisnosti o pušačkom statusu. Kod svih nepušača, a osobito kod zdravih osoba, nađena je aktivacija ERK, dok je kod pušača i bivših pušača oboljelih od KOPB te kod zdravih pušača nađena aktivacija JNK i p38. U usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima, Renda i suradnici (2008) pronašli su veću razinu aktivirane p38 u alveolarnim makrofagima oboljelih od KOPB-a te veći broj stanica pozitivnih na fosforiliranu p38 u stanicama alveolarnih stijenki, što je obrnuto koreliralo s vrijednostima FEV i FEV_1/FVC. Novije istraživanje pokazalo je povećanu ekspresiju fosforilirane p38 u B-stanicama, $CD8^+$ limfocitima, bronhijalnim epitelnim stanicama malih dišnih putova i makrofagima u uzorcima pluća oboljelih od KOPB-a u odnosu na zdrave kontrole (Gaffey i sur., 2013). Štoviše, pokazano je da se inhibicijom p38 smanjuje otpuštanje proupalnih medijatora iz $CD8^+$ limfocita i epitelnih stanica dišnih putova, ukazujući na to da je ekspresija fosforilirane p38 povezana s upalnim procesom.

Na temelju ovih istraživanja možemo zaključiti da je moguće da dim cigareta u nižim, mitogenim koncentracijama aktivira ERK1/2 zbog čega dolazi do hiperplazije i metaplazije epitelnih stanica kod pušača, dok u višim koncentracijama i pri kroničnoj izloženosti aktivira p38 i JNK, te dovodi do upalnog odgovora, povećanog umiranja stanica i propadanja plućnih struktura.

5.7. NERAVNOTEŽA PROTEAZA I ANTIPROTEAZA KAO UZROK POJAČANOG RAZARANJA PLUĆNOG PARENHIMA

Mnoga istraživanja ukazuju na povezanost patološkog procesa u KOPB-u s disregulacijom aktivnosti proteaza, bilo zbog veće aktivnosti proteaza ili zbog nedostatka i disfunkcije proteaznih inhibitora. Proteaze se oslobađaju iz različitih stanica (aktiviranih makrofaga,

neutrofila, epitelnih stanica, fibroblasta) kao odgovor na upalu, prisustvo citokina ili vanjskih čimbenika, poput dima cigarete, a uzrokuju razgradnju izvanstaničnog matriksa. Pri tome nastaju peptidni fragmenti koji imaju kemotaktično djelovanje na leukocite. Tako nastaje krug koji dovodi do progresije bolesti u kronični oblik (Djekic i sur., 2009).

Važnu ulogu u remodeliranju izvanstaničnog matriksa u plućima ima MMP-9. Povećane razine ovog enzima nađene su primjerice u alveolarnim makrofagima (Finlay i sur., 1997), neutrofilima (Segura-Valdez i sur., 2000) i sputumu (Cataldo i sur., 2000) oboljelih od KOPB-a. Kako su povišene razine MMP-9 i TIMP-1 nađene i u epitelnim stanicama pluća bolesnika s KOPB-om i zdravih pušača (Li i sur., 2005), ispitali smo *in vitro* utjecaj ekstrakta dima cigareta na alveolarne epitelne stanice A549. Rezultati su pokazali da A549 stanice ne sadrže MMP-9, ali u medij otpuštaju MMP-2 i TIMP-1. Koncentracija MMP-2 u mediju iznad A549 stanica stimuliranih s ekstraktom dima cigareta nakon 24h inkubacije bila je niža u odnosu na nestimulirane stanice, dok je nakon 48h inkubacije pri niskim koncentracijama dima bila značajno veća (slika 4.24.). Otpuštanje TIMP-1 iz A549 stanica u medij bilo je povećano nakon 48h stimulacije dimom, s time da je razina TIMP-1 u lizatu i mediju iznad A549 stanica izloženih većim koncentracijama dima bila snižena u odnosu na nestimulirane stanice (slika 4.25.). Različita istraživanja dala su proturječne rezultate o ekspresiji i otpuštanju MMP-9, MMP-2 i TIMP-1 iz A549 stanica. Uzevši u obzir dostupne podatke, zaključujemo da A549 stanice konstitutivno eksprimiraju i otpuštaju MMP-2, dok su razine ekspresije MMP-9 i TIMP-1 niske (Zucker i sur., 1992), ali se otpuštanje MMP-9 može inducirati stimulacijom stanica s primjerice konkavalinom A i PMA (d'Ortho i sur., 1997), TNF-α (Lacherade i sur., 2001; Lee i sur., 2010), IL-6 i faktorom rasta hepatocita (eng. *hepatocyte growth factor*, HGF) (To i sur., 2002) te IL-1β (Lin i sur., 2009; Cheng i sur., 2010). Osim toga, Lacherade i suradnici (2001) su pokazali da indukcija MMP-9 s TNF-α vodi do povećane permeabilnosti sloja alveolarnih epitelnih stanica A549, ali i do povećanog otpuštanja TIMP-1 što rezultira održanjem ravnoteže između proteaza i inhibitora. Prema istim autorima, TNF-α nema učinka na ekspresiju MMP-2 u A549 stanicama. Međutim, To i suradnici (2002) su pokazali da stimulacija A549 s IL-6 ili HGF dovodi do povećane sinteze MMP-2. Na primarnim ljudskim fibroblastima pluća pokazano je da dim cigareta povećava ekspresiju i aktivnost MMP-2 ovisno o EGR-1 transkripcijskom faktoru (Ning i sur., 2007). Za indukciju ekspresije MMP-9 s IL-1β u A549 stanicama pokazano je da uključuje aktivaciju sva tri MAPK signalna puta (p42/p44, p38 i JNK), zajedno s translokacijom NF-κB u jezgru i fosforilacijom c-Jun transkripcijskog faktora iz obitelji AP-1 (Lin i sur., 2009).

Prema našim rezultatima, možemo zaključiti da ekstrakt dima cigareta ne inducira otpuštanje MMP-9 iz A549 alveolarnih epitelnih stanica, ali s vremenom dovodi do povećanog otpuštanja MMP-2 i slabijeg otpuštanja TIMP-1, što bi moglo imati učinka na ukupnu neravnotežu proteaza i antiproteaza u izvanstaničnom prostoru alveolarnih epitelnih stanica.

U sputumu oboljelih od KOPB, Beeh i suradnici (2003) pronašli su povećanu koncentraciju MMP-9 te povezanost koncentracije MMP-9 s brojem neutrofila u sputumu i negativnu korelaciju MMP-9 s omjerom FEV_1/FVC. Kako je poznato da se stimulacijom neutrofila može izazvati brzo otpuštanje MMP-9 degranulacijom (Van den Steen 2002), ispitali smo da li se otpuštanje MMP-9 iz polimorfonuklearnih leukocita (PMN) pod utjecajem ekstrakta dima cigareta razlikuje između bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika. Bazalna razina MMP-9 u mediju iznad PMN bolesnika s KOPB-om bila je značajno veća u odnosu na PMN zdravih kontrola, a nakon izlaganja PMN zdravih kontrola ekstraktu dima cigareta razlika u odnosu na PMN bolesnika s KOPB-om izloženih ekstraktu dima cigareta nije bilo. Razlika u omjeru koncentracija MMP-9 u mediju iznad PMN svakog pojedinačnog ispitanika izloženih i neizloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta pokazala je da stimulacijom PMN zdravih kontrola ekstraktom dima cigareta dolazi do značajno većeg otpuštanja MMP-9 u odnosu na bolesnike s KOPB-om (slika 4.27.). Nadalje, rezultati su pokazali da PMN ne otpuštaju TIMP-1 ni u bazalnim uvjetima niti pri stimulaciji ekstraktom dima cigareta, što je u skladu s literaturom u kojoj se navodi da neutrofili ne sintetiziraju TIMP-1 (Van den Steen 2002). Ipak, istraživanje na granulocitima bolesnika s KOPB-om, asmatičara i zdravih kontrola pokazalo je da granulociti u bazalnim uvjetima spontano otpuštaju MMP-9 i TIMP-1, ali bez razlika između skupina, što se povećava stimulacijom granulocita s PMA ili fMLP (Cataldo i sur., 2001). Nedavno objavljeno istraživanje pokazalo je da stimulacija granulocita izoliranih iz krvi bolesnika s KOPB-om s agonistom TLR2 povećava otpuštanje IL-8, IL-6 i MMP-9 (Simpson i sur., 2013). Povećano otpuštanje MMP-9, MMP-2 i elastaze iz PMN zdravih nepušača stimuliranih s dimom cigareta ne može se spriječiti prethodnom inkubacijom PMN sa salmeterolom i flutikazonom, lijekovima koji se inače koriste za liječenje KOPB-a (Mortaz i sur., 2008). Poznato je da dim cigareta u dišnim putovima aktivira makrofage na otpuštanje proupalnih medijatora, poput IL-8, i metaloproteinaza matriksa, kao što je MMP-9 (MacNee, 2005). Nadalje, IL-8 djeluje kemotaktično na neutrofile i potiče ih na otpuštanje MMP-9 koja kida IL-8 (1-77), stvarajući tako aktivniji IL-8 (7-77), čime se stvara pozitivna povratna sprega (Van den Steen i sur., 2000). Osim toga, pokazano je i da ekstrakt dima cigareta inducira otpuštanje IL-8 iz samih neutrofila (Mortaz i sur., 2010). Stoga je moguće da je

pušenje cigareta jedan od uzroka povećanog oslobađanja proteaza iz stanica prisutnih u plućima (u ovom radu dokazano pojačanim otpuštanjem MMP-9 iz PMN zdravih kontrola pod utjecajem dima cigareta), što dovodi do razgradnje izvanstaničnog matriksa. Kako je poznato da pri tome nastaju peptidni fragmenti koji imaju kemotaktično djelovanje na leukocite, nastaje začarani krug koji dovodi do daljnjeg razvoja upale i progresije bolesti u kronični oblik (Djekic i sur., 2009), za što su dokaz PMN bolesnika s KOPB-om koji i u bazalnim uvjetima otpuštaju visoku razinu MMP-9.

S obzirom na proturječne rezultate koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u serumu / plazmi bolesnika s KOPB-om u objavljenim istraživanjima, u ovom radu ispitali smo njihove vrijednosti u plazmi bolesnika i zdravih osoba kako bismo definirali mogućnost korištenja MMP-9 i TIMP-1 kao biokemijskih pokazatelja razaranja plućnog tkiva. Dokazali smo povećanu koncentraciju MMP-9 u plazmi bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave ispitanike, dok razlika u koncentraciji TIMP-1 nije bilo (slika 4.28.). Naši rezultati u skladu su s nekim od prethodno objavljenih istraživanja na uzorcima plazme ili seruma bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika (Mao i sur., 2003; Brajer i sur., 2008; Bolton i sur., 2009; Piesiak i sur., 2011; Yildirim i sur., 2013). Druga istraživanja zabilježila su smanjene ili nepromijenjene koncentracije MMP-9 (D'Armiento i sur., 2013; Higashimoto i sur., 2005; Shaker i sur., 2008) te povećane ili smanjene koncentracije TIMP-1 (Higashimoto i sur., 2005; Ilumets i sur., 2011; Navratilova i sur., 2012; Shaker i sur., 2008; D'Armiento i sur., 2013) kod oboljelih od KOPB-a. Nadalje, u prethodnim istraživanjima primijećeno je da koncentracija MMP-9 raste s težinom bolesti (GOLD stadijem) (Navratilova i sur., 2012), odnosno negativno korelira s FEV_1 (Brajer i sur., 2008; Piesiak i sur., 2011). Također je pokazano da je koncentracija MMP-9 veća u KOPB bolesnika kojima brže opada funkcija pluća, nego u onih bolesnika kojima se funkcija pluća ne smanjuje (Higashimoto i sur., 2009). Međutim, u našem istraživanju nismo pronašli statistički značajne razlike u koncentraciji MMP-9 između podskupina bolesnika s KOPB-om (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4) (tablica 4.4.), te se ona ne može korisiti kao pokazatelj težine bolesti. Ipak, u svim podskupinama bolesnika koncentracija MMP-9 bila je statistički značajno veća nego u zdravih ispitanika. Povišena koncentracija MMP-9 u plazmi već u GOLD 2 stadiju bolesti mogla bi biti rani pokazatelj pojavnosti KOPB-a. Koncentracija TIMP-1 se nije značajno razlikovala između zdravih ispitanika i podskupina bolesnika s KOPB-om (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4), ali je u GOLD 4 podskupini nađena statistički značajno manja koncentracija TIMP-1 nego u GOLD 2

podskupini bolesnika (tablica 4.4.). Niski TIMP-1 u GOLD 4 podskupini mogao bi biti uzrok progresije bolesti u teški oblik.

Kako su se ispitivane skupine razlikovale prema dobi (skupina bolesnika s KOPB-om bila je značajno starija u odnosu na skupinu zdravih ispitanika), istražili smo mogući utjecaj dobi na koncentracije MMP-9 i TIMP-1. Nismo pronašli korelaciju između ovih parametara i dobi ni u zdravih ispitanika niti u bolesnika s KOPB-om (tablica 4.5.), što je djelomično u skladu s rezultatima koje su pokazali Ilumets i suradnici (2011). U tom istraživanju nađeno je da nema razlika u koncentraciji MMP-9 između mlađih (18 - 23 godina) i starijih (37 - 77 godina) ispitanika nepušača, dok je koncentracija TIMP-1 bila niža u starijoj skupini. Korelaciju MMP-9 i dobi u zdravih ispitanika nisu pronašli ni Tayebjee i suradnici (2005), ali su našli slabu negativnu korelaciju TIMP-1 i dobi, dok su Komosinska-Vassev i suradnici (2011) pokazali da koncentracija TIMP-1 slabo, ali pozitivno korelira s dobi zdravih ispitanika. Možemo zaključiti da u našem istraživanju razlika u dobi ispitanika nije utjecala na rezultate koncentracija MMP-9 i TIMP-1 u plazmi.

Ispitivanjem mogućeg utjecaja pušenja na koncentraciju MMP-9 u plazmi nismo pronašli statistički značajne razlike između pušača i nepušača ni u skupini zdravih ispitanika niti u skupini bolesnika s KOPB-om. Međutim, značajno nižu koncentraciju TIMP-1 pronašli smo kod zdravih pušača u usporedbi sa zdravim nepušačima, dok u skupini bolesnika s KOPB-om podijeljenih prema pušačkom statusu nije bilo statistički značajnih razlika. Značajno veće koncentracije MMP-9 pronađene su u bolesnika s KOPB-om pušača u odnosu na zdrave pušače te u bolesnika s KOPB-om nepušača u odnosu na zdrave nepušače, dok razlika u koncentraciji TIMP-1 nije bilo (tablica 4.6.). Navratilova i suradnici (2012) su objavili slične rezultate u serumu ispitanika. Prema njihovom istraživanju koncentracija MMP-9 je također bila veća u bolesnika s KOPB-om pušača u odnosu na zdrave pušače te u bolesnika s KOPB-om nepušača u odnosu na zdrave nepušače, dok razlika u koncentraciji TIMP-1 između bolesnika s KOPB-om pušača i zdravih pušača nije bilo, ali je koncentracija TIMP-1 bila veća u bolesnika s KOPB-om nepušača u odnosu na zdrave nepušače. Suprotno našem istraživanju, Ilumets i suradnici (2011) su pronašli veću koncentraciju MMP-9 u plazmi pušača nego nepušača, dok razlika u koncentraciji TIMP-1 nije bilo. Veću koncentraciju MMP-9 u plazmi pušača nego u nepušača opisali su i Nakamura i suradnici (1998). Štoviše, koncentracija MMP-9 je bila veća u pušača koji su pušili više od 20 godina, nego kod onih koji su pušili manje od 20 godina. Također su pokazali da je koncentracija MMP-9 bila manja kod pušača

koji su prestali pušiti na 6 mjeseci nego kod onih koji su nastavili. Možemo zaključiti da se opažena povišena koncentracija MMP-9 u bolesnika s KOPB-om ne može jednostavno objasniti utjecajem pušenja, već da je povezana i s nekim drugim patofiziološkim procesima u KOPB-u. Snižena koncentracija TIMP-1 u zdravih pušača mogla biti ukazivati na početnu smanjenu sposobnost inhibicije proteaza koja bi s vremenom mogla dovesti do neravnoteže između proteaza i antiproteaza.

Iako je spirometrija dobro poznata i uspostavljena metoda za dijagnozu KOPB-a i praćenje progresije bolesti, dijagnoza bolesti se često postavlja u kasnijim stadijima kada je bolest već uznapredovala. Stoga postoji jasna potreba za specifičnim biomarkerima koji bi omogućili postavljanje dijagnoze u asimptomatskih bolesnika te u ranoj fazi bolesti. Iz tog razloga smo kao dio ovog istraživanja analizom ROC krivulja ispitali dijagnostičku točnost koncentracija MMP-9 i TIMP-1 kao mogućih biokemijskih biljega za razlikovanje oboljelih od KOPB-a i zdravih osoba. Rezultati ROC analize su pokazali vrlo dobru dijagnostičku točnost za koncentraciju MMP-9 (slika 4.29. i tablica 4.7.), što je čini dobrim biljegom za razlikovanje bolesnika s KOPB-om i zdravih osoba. TIMP-1 se pokazao kao loš diskriminacijski parametar, što je u skladu s nepromijenjenim vrijednostima ovog parametra između bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika. Zanimljivo je da je prethodno objavljeno istraživanje na temelju ROC analize pokazalo lošu dijagnostičku točnost i za koncentraciju MMP-9 i za TIMP-1 u plazmi KOPB bolesnika te zdravih pušača i nepušača (Ilumets i sur., 2011). Na temelju naših rezultata možemo predložiti optimalnu graničnu vrijednost koncentracije MMP-9 (>147,93 ng/mL) za koju bi vrijedilo da vjerojatnije ukazuje na osobu oboljelu od KOPB-a, nego da se radi o zdravoj osobi. Nedostaci korištenja ovog parametara u svakodnevnoj praksi bili bi visoka cijena samog testa te činjenica da povećane koncentracije MMP-9 enzima nalazimo u mnogim drugim bolestima, poput bolesti kostiju, reumatoidnog artritisa, Alzheimerove bolesti i različitih tumora. Budući da nije vjerojatno da će ijedan biomarker pojedinačno dati jedinstvenu informaciju o bolesti, kombinacija dva ili više biljega mogla bi imati veću dijagnostičku i prognostičku vrijednost. Tako je multivarijatna logistička regresijska analiza naših rezultata pokazala da se dijagnostička točnost povećava kombinacijom koncentracije MMP-9 u plazmi s koncentracijom CRP-a u serumu te udjelom segmentiranih neutrofila i limfocita u krvi (AUC = 0,975; 95 % interval pouzdanosti = 0,913 - 0,997; $P<0,05$) (tablica 4.8.), što čini ova četiri parametra neovisnim prediktorima bolesti.

Kako bismo utvrdili moguću povezanost povišene koncentracije MMP-9 u plazmi s genskim varijacijama kod oboljelih od KOPB, ispitali smo učestalost dva polimorfizama u promotorskoj regiji gena za MMP-9 (-1562 C/T i $(CA)_n$ dinukleotidna ponavljanja) te jednog polimorfizma u egzonu 6 gena za MMP-9 (Q279R) koji se povezuje s mogućom promjenom aktivnosti ovog enzima. Ni za jedan od ispitivanih polimorfizama *MMP9* gena nismo pronašli značajne razlike u učestalosti genotipova niti u učestalosti alela između skupina bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika (tablice 4.9. i 4.10.). Također, nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji MMP-9 ovisno o genotipu *MMP9* gena (za sva tri ispitana polimorfizma) niti u jednoj skupini ispitanika (tablica 4.11.). Prethodna istraživanja polimorfizma jednog nukleotida -1562 C/T pokazala su veću učestalost T alela kod oboljelih od KOPB u japanskoj i kineskoj Han populaciji (Minematsu i sur., 2001, Zhou i sur., 2004, Ito i sur., 2005). Međutim, Joos i suradnici (2002) su pronašli povezanost polimorfizama MMP-1 i MMP-12, ali ne i MMP-9 (-1562 C/T i $(CA)_n$ ponavljanja), sa smanjenjem plućne funkcije pušača. Tijekom ispitivanja povezanosti polimorfizama MMP-1, MMP-2 i MMP-9 s razvojem KOPB-a u populaciji američkih veterana pušača, nađena je veća učestalost 279Arg homozigota među oboljelima od KOPB, a analizom haplotipa zaključeno je da su 279Arg i veći broj $(CA)_n$ dinukleotidnih ponavljanja povezani s rizikom razvoja KOPB-a (Tesfaigzi i sur., 2006). Istraživanje na brazilskoj populaciji nije pokazalo postojanje povezanosti polimorfizama u promotorima gena za MMP-3, MMP-9 (-1562 C/T) i MMP-12 s razvojem KOPB-a (Schirmer i sur., 2009). Haq i suradnici (2010) su genotipizirali 26 polimorfizama jednog nukleotida u genima za MMP-1, MMP-9 i MMP-12 u skupinama od 977 oboljelih od KOPB-a i 876 zdravih pušača europskog porijekla te su pronašli povezanost samo dva polimorfizma MMP-12 s teškim i vrlo teškim stadijima bolesti. Suprotno ostalim istraživanjima, Lee i suradnici (2010) su izvijestili kako je T alel na poziciji -1562 pb u promotoru gena za MMP-9 značajno rjeđi u oboljelih od KOPB u koreanskoj populaciji. Nedavno istraživanje provedeno na dvjema velikim skupinama Nizozemaca pokazalo je da polimorfizmi jednog nukleotida u genima za MMP-1, MMP-2, MMP-9 i MMP-12 ne utječu na sniženje FEV_1, već da se značajan pad FEV_1 može predvidjeti prisustvom polimorfizma Phe124Phe u genu za TIMP-1 (van Diemen i sur., 2011). Dakle, postoji velika proturječnost o uključenosti ispitivanih polimorfizama gena za MMP-9 u nastanak KOPB-a. To bi se moglo objasniti lažno pozitivnim rezultatima, malom snagom istraživanja zbog veličine uzorka, etničkim razlikama ili neprimjerenim odabirom kontrolnih ispitanika. Tome u prilog ide nedavno provedena meta-analiza koja je pokazala da postoji povezanost -1562 C/T polimorfizma *MMP9* gena i rizika razvoja KOPB-a, ali je on značajan u skupini Azijata (ne i

u skupini bijelaca) te postoji povezanost kada kontrolnu skupinu čine zdravi pušači (Chen i sur., 2013). Stoga su potrebna daljnja istraživanja na velikom broju ispitanika, s dobro definiranim skupinama i uz upotrebu nepristranih metoda kako bi se razjasnila uloga polimorfizama MMP-9 u KOPB-u.

5.8. DPPIV KAO POTENCIJALNI NOVI BILJEG KOPB-a

Jedna od proteaza čija je smanjena aktivnost zabilježena u raznim kroničnim upalnim bolestima je DPPIV. S obzirom da DPPIV kida različite biološki aktivne molekule, uključujući kemokine, pretpostavljamo da bi njezina promijenjena aktivnost u plućima mogla pridonositi razvoju upale. U našem istraživanju sistemsku upalu u bolesnika s KOPB-om dokazali smo povećanom koncentracijom ukupnih leukocita, neutrofila i CRP (tablica 4.3.; prema Somborac Bačura i sur., 2012). Nadalje, u serumu bolesnika sa stabilnom KOPB pronašli smo značajno smanjenu aktivnost DPPIV u usporedbi sa zdravim kontrolama (slika 4.37.; prema Somborac Bačura i sur., 2012). Međutim, nismo našli statistički značajne razlike u aktivnosti DPPIV između podskupina bolesnika s KOPB-om (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4) (tablica 4.12.; prema Somborac Bačura i sur., 2012), te se ovaj parametar ne može korisiti kao pokazatelj težine bolesti. Ipak, u svim podskupinama bolesnika aktivnost DPPIV bila je statistički značajno manja nego u zdravih ispitanika. Snižena aktivnost DPPIV u serumu već u GOLD 2 stadiju bolesti mogla bi biti rani pokazatelj pojavnosti KOPB-a. Ovo zapažanje samo je djelomično u skladu s istraživanjem učinjenim na bioptatu bronhijalnog tkiva bolesnika s kroničnom upalom bronha (među kojima su bili i oboljeli od KOPB-a) gdje je aktivnost DPPIV obrnuto korelirala sa stupnjem kronične upale dišnih putova (Landis i sur., 2008). Istraživanje na bioptatima tkiva iz nosa bolesnika s kroničnim rinosinusitisom također je pokazalo da se smanjena aktivnost DPPIV može povezati s većim brojem upalnih stanica (Grouzmann i sur., 2002). U slučaju astme, još jedne učestale kronične bolesti pluća, neka istraživanja su pokazala da nema razlika u aktivnosti i koncentraciji DPPIV u serumu u usporedbi sa zdravim kontrolama (Van Der Velden i sur., 1999, Remes i sur., 2011), dok je u jednom istraživanju nađena povećana koncenracija DPPIV u plazmi (Lun i sur., 2007). Predloženi mehanizmi snižene regulacije DPPIV tijekom kronične upale u nosnoj sluznici, bronhima ili hrskavici su slični i vjerojatno uključuju neke specifične supstrate važne u patofiziologiji odgovarajućih bolesti (Grouzmann i sur., 2002, Landis i sur., 2008, Busso i sur., 2005). U ovom radu zabilježili smo značajno sniženi udio limfocita u ukupnom broju leukocita u bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim kontrolama (tablica 4.3.; prema

Somborac Bačura i sur., 2012). Pod pretpostavkom da je veći dio topivog oblika DPPIV u serumu porijeklom iz limfocita, opažena smanjena aktivnost DPPIV mogla bi se, barem djelomice, objasniti sniženim brojem limfocita u krvi. Međutim, složeni kronični upalni proces u KOPB-u također bi mogao voditi do smanjenog otpuštanja DPPIV s membrane stanica ili bi enzim mogao biti inhibiran interakcijom s nekim molekulama koje sudjeluju u razvoju kronične upale u KOPB-u (Lambeir i sur., 2003).

Kako su se ispitivane skupine razlikovale prema dobi, istražili smo mogući utjecaj dobi na aktivnost DPPIV. Nismo pronašli korelaciju između aktivnosti DPPIV i dobi ni u zdravih ispitanika niti u bolesnika s KOPB-om (slika 4.38.) (Somborac Bačura i sur., 2012), što je u skladu s rezultatima koje su pokazali De Chiara i suradnici (2009). U tom istraživanju, koje je provedeno na velikom broju zdravih ispitanika, nađeno je da nema povezanosti između koncentracije DPPIV u serumu i dobi.

Ispitivanjem mogućeg utjecaja pušenja na aktivnost DPPIV nismo pronašli statistički značajne razlike između pušača, bivših pušača i nepušača ni u skupini zdravih ispitanika niti u skupini bolesnika s KOPB-om. Značajno manje aktivnosti DPPIV pronađene su u bolesnika s KOPB-om pušača i nepušača u odnosu na zdrave ispitanike pušače i nepušače (slika 4.39.; prema Somborac Bačura i sur., 2012). Ispitivanja aktivnosti DPPIV u bronhoalveolarnom ispirku pušača i nepušača također su pokazala da razlike ne postoje (Juillerat-Jeanneret i sur., 1997; Van Der Velden i sur., 1999). Možemo zaključiti da su opažene snižene aktivnosti DPPIV povezane s nekim drugim patofiziološkim procesom koji je dio KOPB-a, ali ne i s pušenjem.

Dijagnostička točnost aktivnosti DPPIV kao mogućeg biokemijskog biljega za razlikovanje oboljelih od KOPB-a i zdravih osoba ispitana je analizom ROC krivulja. Rezultati ROC analize pokazali su vrlo dobru dijagnostičku točnost za aktivnost DPPIV s površinom ispod ROC krivulje (AUC) od 0,801 (95 % interval pouzdanosti = 0,727 - 0,863; $P<0,001$) (slika 4.40. i tablica 4.13.; prema Somborac Bačura i sur., 2012). Na temelju ovih rezultata možemo predložiti optimalnu graničnu vrijednost aktivnosti DPPIV ($\leq$26,72 U/L) za koju bi vrijedilo da vjerojatnije ukazuje na osobu oboljelu od KOPB-a, nego da se radi o zdravoj osobi. Navedeni rezultati ukazuju da bi se aktivnost DPPIV mjerena spektrofotometrijski u serumu mogla koristiti kao vrijedan i jednostavan biokemijski pokazatelj bolesti u svakodnevnoj praksi. Da bismo ocijenili pouzdanost aktivnosti DPPIV kao ranog biomarkera, potrebno je

ispitati i aktivnost DPPIV u najranijoj, GOLD 1, fazi bolesti. Postoji samo nekoliko istraživanja o biomarkerima testiranim u GOLD 1 i 2 fazama. Hacker i suradnici (2009) su pronašli statističke razlike u razini HSP27, HSP70, IL-6 i CRP između zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om u GOLD 1 i 2 fazama. Štoviše, ista skupina autora je nedavno predložila da bi se povećana koncentracija HSP27 u serumu mogla koristiti kao rani biljeg KOPB-a u naizgled zdravih pušača (Ankersmit i sur., 2012). Drugo istraživanje pokazalo je značajno povećan CRP u GOLD 2 fazi (Torres-Ramos i sur., 2009), međutim CRP nije specifičan biljeg za KOPB (Patel i sur., 2010). Vjerojatnije je da će kombinacija dva ili više parametara dati veću dijagnostičku i prognostičku vrijednost pojedinim biomarkerima. Tako je multivarijatna logistička regresijska analiza naših rezultata pokazala da se dijagnostička točnost povećava kombinacijom aktivnosti DPPIV u serumu s koncentracijom CRP-a u serumu i udjelom limfocita u krvi (AUC = 0,933; 95 % interval pouzdanosti = 0,879 - 0,968; $P<0,05$) (tablica 4.14.) (prema Somborac Bačura i sur., 2012), što čini ova tri parametra neovisnim prediktorima bolesti. Kako bi konačno definirali DPPIV novim biljegom za KOPB, osim mjerenja u ranim fazama bolesti potrebna su dodatna ispitivanja patofiziološke uloge ovog enzima u nastanku i razvoju bolesti.

5.9. ZAVRŠNA RAZMATRANJA

Pušenje cigareta je najvažniji čimbenik rizika razvoja KOPB-a. Kako samo dio pušača razvije bolest, jasno je da u patogenezi bolesti važnu ulogu imaju još i genska predispozicija te čimbenici okoliša. Dim cigareta izaziva upalu u dišnim putovima, ali kod osjetljivih pojedinaca koji razviju bolest taj upalni odgovor je neprimjeren, te dovodi do opstrukcije dišnih putova. Štoviše, sva tri procesa uključena u patogenezu KOPB-a opisana u ovom radu (kronična upala, oksidacijski stres te neravnoteža proteaza i antiproteaza) međusobno su ovisni mehanizmi koji uključuju brojne interakcije tijekom razvoja bolesti. Neučinkovit proces popravka oštećenja uzrokovanih dimom cigareta i neravnoteža u remodeliranju izvanstaničnog matriksa podloga su kroničnom tijeku bolesti i razaranju plućnog parenhima. Nadamo se da rezultati ovog rada pridonose boljem poznavanju tih kompleksnih odnosa, jer razumijevanje patogeneze je osnova ranijem postavljanju dijagnoze bolesti, ali i učinkovitijem liječenju bolesnika.

6. ZAKLJUČCI

Pušenje cigareta jedan je od glavnih čimbenika rizika za razvoj KOPB-a, ali unatoč brojnim dosadašnjim saznanjima postoji potreba za još boljim razumijevanjem na koji način pridonosi patofiziologiji bolesti, kako bi se omogućilo brže prepoznavanje i postavljanje dijagnoze kod oboljelih.

1. Ispitivanjem citotoksičnosti ekstrakta dima cigareta na ljudskim alveolarnim epitelnim stanicama linije A549 došli smo do zaključka da kraćim izlaganjem (4h) pri različitim koncentracijama (5 %, 10 % i 20 %) stanice umiru apoptozom ($P<0,01$), dok veće koncentracije dima (10 i 20 %) tijekom dužeg perioda izlaganja (24h) dovode do smrti stanica u obliku nekroze ($P<0,001$).
2. Dim cigareta, koji sadrži brojne oksidanse i reaktivne kisikove i dušikove spojeve, uzrokuje oštećenja različitih staničnih struktura, što se u A549 stanicama očituje povećanjem koncentracije MDA (produkta lipidne peroksidacije) ($P<0,05$) i smanjenjem koncentracije slobodnih tiolnih skupina proteina ($P<0,05$) ovisno o koncentraciji dima.
3. Proteini oštećeni dimom cigareta usmjeravaju se za razgradnju putem proteasoma konjugacijom s molekulama ubikvitina, što smo dokazali povišenom razinom ubikvitin-proteinskih konjugata u stanicama izloženim izravnom djelovanju dima cigareta u odnosu na netretirane stanice.
4. Izlaganjem A549 stanica dimu cigareta, dolazi do aktivacije ER stresnog odgovora, a to dokazuje povećana razina fosforiliranog eIF2α, te smanjena *de novo* sinteza proteina ($P<0,01$).
5. Smanjena sinteza proteina vjerojatno pridonosi povećanju razine slobodnih aminokiselina unutar A549 stanica ($P<0,05$) zajedno s razgradnjom proteina oštećenih dimom cigareta za koju smo dokazali da se odvija putem proteasoma.
6. Iako se UPR obično povezuje s povećanom aktivnosti proteasoma, mi smo zabilježili značajno smanjenje sve tri aktivnosti proteasoma (kaspazne, tripsinske i kimotripsinske) pod utjecajem dima cigareta u različitim vremenima ($P<0,01$), što ih čini nedovoljno učinkovitima u procesu uklanjanja oštećenih proteina.
7. Kao dio staničnog odgovora na stres, u A549 stanicama izloženim ekstraktu dima cigareta u koncentraciji od 20 % tijekom 8 h te u koncentraciji od 10 % i 20 % tijekom 24 h dolazi do porasta ekspresije HSP32. Nakon 48 h stimulacije s ekstraktom dima

cigareta u koncentraciji od 20 % dolazi i do porasta ekspresije HSP27. Ekspresija HSP70 nije pokazala statistički značajnu ovisnost o koncentraciji dima u ispitivanim vremenima.

8. Također dolazi i do promjena u MAPK signalnim putovima. Ekstrakt dima cigareta ne utječe značajno na razinu ekspresije ukupnih ERK, JNK i p38 u A549 stanicama, ali različito aktivira pojedine MAPK: ne dolazi do značajnijih promjena u aktivaciji ERK, aktivaciju JNK nismo uspjeli detektirati, ali nakon 24h u stanicama tretiranim ekstraktom dima cigareta (20 %) dolazi do značajnog porasta razine aktivirane p38 ($P<0,001$).
9. Rezultati su pokazali da A549 stanice ne sadrže MMP-9, ali pod utjecajem ekstrakta dima cigareta s vremenom u medij povećano otpuštaju MMP-2, a TIMP-1 otpuštaju u manjoj količini nego netretirane stanice, što bi moglo pridonijeti ukupnoj neravnoteži proteaza i antiproteaza u izvanstaničnom prostoru alveolarnih epitelnih stanica.
10. U bazalnim uvjetima PMN bolesnika s KOPB-om otpuštaju značajno više MMP-9 u odnosu na PMN zdravih kontrola ($P=0,016$), dok nakon izlaganja PMN zdravih kontrola ekstraktu dima cigareta nema razlika u odnosu na PMN bolesnika s KOPB-om izloženih ekstraktu dima cigareta. Razlika u omjeru koncentracija MMP-9 u mediju iznad PMN svakog pojedinačnog ispitanika izloženih i neizloženih djelovanju ekstrakta dima cigareta pokazuje da stimulacijom PMN zdravih kontrola ekstraktom dima cigareta dolazi do povećanog otpuštanja MMP-9 u odnosu na bolesnike s KOPB-om ($P=0,025$), što dokazuje kroničnu aktivaciju PMN bolesnika i njihovu moguću ulogu u razvoju upale i razgradnji izvanstaničnog matriksa u plućima.
11. Sistemska neravnoteža proteaza i antiproteaza očituje se povećanom koncentracijom MMP-9 (204,13 (115,70 - 351,24) ng/mL) u plazmi bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave ispitanike (70,25 (52,48 - 104,96) ng/mL) ($P<0,001$), dok razlika u koncentraciji TIMP-1 nije bilo. Povećana koncentracija MMP-9 javlja se već u GOLD 2 podskupini bolesnika s KOPB-om, ali bez statistički značajnih razlika između stadija bolesti (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4).
12. Nismo pronašli statistički značajne razlike u koncentraciji MMP-9 u plazmi između pušača i nepušača ni u skupini zdravih ispitanika niti u skupini bolesnika s KOPB-om, ali smo pronašli značajno nižu koncentraciju TIMP-1 kod zdravih pušača u usporedbi

sa zdravim nepušačima, dok u skupini bolesnika s KOPB-om podijeljenih prema pušačkom statusu razlika u koncentraciji TIMP-1 nije bilo.

13. Analiza ROC krivulja pokazala je vrlo dobru dijagnostičku točnost za koncentraciju MMP-9 u plazmi (AUC = 0,884), što je čini dobrim biljegom za razlikovanje bolesnika s KOPB-om i zdravih osoba, dok je multivarijatna logistička regresijska analiza pokazala da se dijagnostička točnost povećava kombinacijom koncentracije MMP-9 s koncentracijom CRP-a te udjelom segmentiranih neutrofila i limfocita u krvi (AUC = 0,975), što čini ova četiri parametra neovisnim prediktorima bolesti.

14. Ispitivanjem učestalosti polimorfizama *MMP9* gena (-1562 C/T i $(CA)_n$ dinukleotidna ponavljanja u promotorskoj regiji gena te Q279R u egzonu 6 gena za MMP-9) nismo pronašli statistički značajne razlike između skupina bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika, niti povezanost koncentracije MMP-9 s genotipovima ispitanika.

15. U serumu bolesnika s KOPB-om, kod kojih je dokazana sistemska upala (povećana koncentracija ukupnih leukocita, neutrofila i CRP), nalazimo smanjenu aktivnost DPPIV (23,05 (14,41 - 31,02) U/L), proteaze koja bi mogla pridonositi razvoju upale, u odnosu na zdrave ispitanike (39,01 (31,68 - 51,45) U/L). Snižena aktivnost DPPIV javlja se već u GOLD 2 podskupini bolesnika s KOPB-om, ali bez statistički značajnih razlika između stadija bolesti (GOLD 2, GOLD 3 i GOLD 4).

16. Također smo pokazali da na aktivnost DPPIV ne utječe pušački status ispitanika.

17. S obzirom na dokazanu vrlo dobru dijagnostičku točnost aktivnosti DPPIV u serumu (AUC = 0,801), ovaj enzim bi se također mogao koristiti kao učinkovit biokemijski pokazatelj KOPB-a. Multivarijatna logistička regresijska analiza pokazala je da se dijagnostička točnost povećava kombinacijom aktivnosti DPPIV s koncentracijom CRP-a i udjelom limfocita u krvi (AUC = 0,933), što čini i ovaj parametar neovisnim prediktorom bolesti.

7. POPIS LITERATURE

A549 (ATCC® CCL-185™), 2012., www.lgcstandards-atcc.org, pristupljeno 16. siječnja 2013.

Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12(4), 361-7.

Abello N, Geurink PP, van der Toorn M, van Oosterhout AJ, Lugtenburg J, van der Marel GA, Kerstjens HA, Postma DS, Overkleeft HS, Bischoff R. Poly(ethylene glycol)-based stable isotope labeling reagents for the quantitative analysis of low molecular weight metabolites by LC-MS. *Anal Chem*, 2008, 80(23), 9171-80.

Adcock IM, Chung KF, Caramori G, Ito K. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol*, 2006, 533(1-3), 118-32.

Ankersmit HJ, Nickl S, Hoeltl E, Toepker M, Lambers C, Mitterbauer A, Kortuem B, Zimmermann M, Moser B, Bekos C, Steinlechner B, Hofbauer H, Klepetko W, Schenk P, Dome B. Increased serum levels of HSP27 as a marker for incipient chronic obstructive pulmonary disease in young smokers. *Respiration*, 2012, 83(5), 391-9.

Babusyte A, Stravinskaite K, Jeroch J, Lötvall J, Sakalauskas R, Sitkauskiene B. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and ex-smokers with COPD. *Respir Res*, 2007, 8, 81.

Baglole CJ, Sime PJ, Phipps RP. Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(4), L624-36.

Barišić K. Heat shock proteins and immunity. U: Biochemistry and immunology intersections. Markotić A (ur.), Trivandrum, Research Signpost, 2008, str. 29-36.

Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloprotinease-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med*, 2003, 97(6), 634-9.

Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 2001, 292(5521), 1552-5.

Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159(6), 1985-91.

Bolton CE, Stone MD, Edwards PH, Duckers JM, Evans WD, Shale DJ. Circulating matrix metalloproteinase-9 and osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*, 2009, 6(2), 81-7.

Boschetto P, Quintavalle S, Zeni E, Leprotti S, Potena A, Ballerin L, Papi A, Palladini G, Luisetti M, Annovazzi L, Iadarola P, De Rosa E, Fabbri LM, Mapp CE. Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2006, 61(12), 1037-42.

Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*, 1976, Suppl 5, 9-15.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72, 248-54.

Brajer B, Batura-Gabryel H, Nowicka A, Kuznar-Kaminska B, Szczepanik A. Concentration of matrix metalloproteinase-9 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and a degree of airway obstruction and disease progression. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59, Suppl 6, 145-52.

Busso N, Wagtmann N, Herling C, Chobaz-Péclat V, Bischof-Delaloye A, So A, Grouzmann E. Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am J Pathol*, 2005, 166(2), 433-42.

Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, Rea F, Loy M, Zuin R, Marulli G, Baraldo S, Saetta M, Valente M. Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res*, 2005, 6, 14.

Cataldo D, Munaut C, Noël A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM, Louis R. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, 123(3), 259-67.

Cataldo D, Munaut C, Noël A, Frankenne F, Bartsch P, Foidart JM, Louis R. Matrix metalloproteinases and TIMP-1 production by peripheral blood granulocytes from COPD patients and asthmatics. *Allergy*, 2001, 56(2), 145-51.

Cavalcante AG, de Bruin PF. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pneumol*, 2009, 35(12), 1227-37.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*, 2003, 253(1-2), 269-85.

Chen L, Wang T, Liu L, Shen Y, Wan C, Wen F. Matrix metalloproteinase-9 -1562C/T promoter polymorphism confers risk for COPD: a meta-analysis. *PLoS One*, 2013, 8(3), e60523.

Cheng CY, Kuo CT, Lin CC, Hsieh HL, Yang CM. IL-1beta induces expression of matrix metalloproteinase-9 and cell migration via a c-Src-dependent, growth factor receptor transactivation in A549 cells. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(7), 1595-610.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2013., www.who.int, pristupljeno 21. veljače 2013.

Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 1985, 64, 111-26.

Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ*, 2005, 12(9), 1178-90.

Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1986, 17(3), 259-63.

Colombo G, Dalle-Donne I, Orioli M, Giustarini D, Rossi R, Clerici M, Regazzoni L, Aldini G, Milzani A, Butterfield DA, Gagliano N. Oxidative damage in human gingival fibroblasts exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(9), 1584-96.

Csordas A, Kreutmayer S, Ploner C, Braun PR, Karlas A, Backovic A, Wick G, Bernhard D. Cigarette smoke extract induces prolonged endoplasmic reticulum stress and autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(1), 141-8.

Cuchacovich M, Gatica H, Pizzo SV, Gonzalez-Gronow M. Characterization of human serum dipeptidyl peptidase IV (CD26) and analysis of its autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 2001, 19(6), 673-80.

Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med*, 2005, 99(6), 703-10.

Dance A. Health impact: Breathless. *Nature*, 2012, 489(7417), S2-3.

D'Armiento JM, Goldklang MP, Hardigan AA, Geraghty P, Roth MD, Connett JE, Wise RA, Sciurba FC, Scharf SM, Thankachen J, Islam M, Ghio AJ, Foronjy RF. Increased matrix metalloproteinase (MMPs) levels do not predict disease severity or progression in emphysema. *PLoS One*, 2013, 8(2), e56352.

Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*. 2001, 83(3-4), 301-10.

De Chiara L, Rodríguez-Piñeiro AM, Cordero OJ, Rodríguez-Berrocal FJ, Ayude D, Rivas-Hervada And FJ, de la Cadena MP. Soluble CD26 levels and its association to epidemiologic parameters in a sample population. *Dis Markers*, 2009, 27(6), 311-6.

Decramer M, Janssens W, Miravitlles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 2012, 379(9823), 1341-51.

Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res*, 2006, 7, 53.

Demeo DL, Mariani TJ, Lange C, Srisuma S, Litonjua AA, Celedon JC, Lake SL, Reilly JJ, Chapman HA, Mecham BH, Haley KJ, Sylvia JS, Sparrow D, Spira AE, Beane J, Pinto-Plata V, Speizer FE, Shapiro SD, Weiss ST, Silverman EK. The SERPINE2 gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet*, 2006, 78(2), 253-64.

Deslee G, Woods JC, Moore C, Conradi SH, Gierada DS, Atkinson JJ, Battaile JT, Liu L, Patterson GA, Adair-Kirk TL, Holtzman MJ, Pierce RA. Oxidative damage to nucleic acids in severe emphysema. *Chest*, 2009, 135(4), 965-74.

Detel D, Persić M, Varljen J. Serum and intestinal dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007, 45(1), 65-70.

Djekic UV, Gaggar A, Weathington NM. Attacking the multi-tiered proteolytic pathology of COPD: new insights from basic and translational studies. *Pharmacol Ther*, 2009, 121(2), 132-46.

d'Ortho MP, Clerici C, Yao PM, Delacourt C, Delclaux C, Franco-Montoya ML, Harf A, Lafuma C. Alveolar epithelial cells in vitro produce gelatinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Am J Physiol*, 1997, 273(3 Pt 1), L663-75.

Drury JA, Nycyk JA, Cooke RW. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. *Clin Chim Acta*, 1997, 263(2), 177-85.

Ellman GL. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys*, 1958, 74(2), 443-50.

Favatier F, Polla BS. Tobacco-smoke-inducible human haem oxygenase-1 gene expression: role of distinct transcription factors and reactive oxygen intermediates. *Biochem J*, 2001, 353(Pt 3), 475-82.

Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156(1), 240-7.

Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2011, 6, 413-21.

Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem J*, 1991, 277(Pt 1), 133-8.

Friguet B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett*, 2006, 580(12), 2910-6.

Fujita J, Nelson NL, Daughton DM, Dobry CA, Spurzem JR, Irino S, Rennard SI. Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis*, 1990, 142(1), 57-62.

Fukano Y, Oishi M, Chibana F, Numazawa S, Yoshida T. Analysis of the expression of heme oxygenase-1 gene in human alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *J Toxicol Sci*, 2006, 31(2), 99-109.

Gaffey K, Reynolds S, Plumb J, Kaur M, Singh D. Increased phosphorylated p38 mitogen activated protein kinase in COPD lungs. *Eur Respir J*, 2013, 42(1), 28-41.

Garrett RJ, Jackson MA. Cigarette smoke and protein synthesis in the lung. *Environ Res*, 1980, 21(2), 399-406.

Geraghty P, Wallace A, D'Armiento JM. Induction of the unfolded protein response by cigarette smoke is primarily an activating transcription factor 4-C/EBP homologous protein mediated process. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2011, 6, 309-19.

Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 2002, 82(2), 373-428.

Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2013., www.goldcopd.org, pristupljeno 21. veljače 2013.

Golpon HA, Coldren CD, Zamora MR, Cosgrove GP, Moore MD, Tuder RM, Geraci MW, Voelkel NF. Emphysema lung tissue gene expression profiling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(6), 595-600.

Grouzmann E, Monod M, Landis B, Wilk S, Brakch N, Nicoucar K, Giger R, Malis D, Szalay-Quinodoz I, Cavadas C, Morel DR, Lacroix JS. Loss of dipeptidylpeptidase IV activity in chronic rhinosinusitis contributes to the neurogenic inflammation induced by substance P in the nasal mucosa. *FASEB J*, 2002, 16(9), 1132-4.

Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J*, 1997, 11(7), 526-34.

Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol*, 2006, 533(1-3), 133-44.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 40.

Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz 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(1-2), 31-40.

Haq I, Chappell S, Johnson SR, Lotya J, Daly L, Morgan K, Guetta-Baranes T, Roca J, Rabinovich R, Millar AB, Donnelly SC, Keatings V, MacNee W, Stolk J, Hiemstra PS, Miniati M, Monti S, O'Connor CM, Kalsheker N. Association of MMP-12 polymorphisms with severe and very severe COPD: a case control study of MMPs-1, 9 and 12 in a European population. *BMC Med Genet*, 2010, 11, 7.

Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*, 1997, 277(5334), 2002-4.

Haynes CM, Titus EA, Cooper AA. Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell*, 2004, 15(5), 767-76.

Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res*, 2002, 3, 22.

Hengstermann A, Müller T. Endoplasmic reticulum stress induced by aqueous extracts of cigarette smoke in 3T3 cells activates the unfolded-protein-response-dependent PERK pathway of cell survival. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(6), 1097-107.

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67, 425-79.

Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, Sato H, Masuda M, Itoh H. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J*, 2005, 25(5), 885-90.

Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 2009, 103(8), 1231-8.

Hoseki J, Ushioda R, Nagata K. Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem*, 2010, 147(1), 19-25.

Hoshino S, Yoshida M, Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Mawatari H, Yamane H, Kijima T, Kumagai T, Osaki T, Tachiba I, Kawase I. Cigarette smoke extract induces endothelial cell injury via JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(1), 58-63.

Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(2), L509-16.

Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, Stidley C, Melén E, Söderhäll C, Hallberg J, Kull I, Kere J, Svartengren M, Pershagen G, Wickman M, Lange C, Demeo DL, Hersh CP, Klanderman BJ, Raby BA, Sparrow D, Shapiro SD, Silverman EK, Litonjua AA, Weiss ST, Celedón JC. MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med*, 2009, 361(27), 2599-608.

Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, Koarai A, Shirato K. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(2 Pt 1), 701-6.

Ilumets H, Mazur W, Toljamo T, Louhelainen N, Nieminen P, Kobayashi H, Ishikawa N, Kinnula VL. Ageing and smoking contribute to plasma surfactant proteins and protease imbalance with correlations to airway obstruction. *BMC Pulm Med*, 2011, 11, 19.

Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J*, 2005, 25(2), 250-8.

Isik B, Ceylan A, Isik R. Oxidative stress in smokers and non-smokers. *Inhal Toxicol*, 2007, 19(9), 767-9.

Ito I, Nagai S, Handa T, Muro S, Hirai T, Tsukino M, Mishima M. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(11), 1378-82.

Jiang HY, Wek RC. Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J Biol Chem*, 2005, 280(14), 14189-202.

Jiao ZX, Ao QL, Xiong M. Cigarette smoke extract inhibits the proliferation of alveolar epithelial cells and induces apoptosis. *Sheng Li Xue Bao*, 2006, 58(3), 244-54.

Joos L, He JQ, Shepherdson MB, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(5), 569-76.

Jorgensen E, Stinson A, Shan L, Yang J, Gietl D, Albino AP. Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells. *BMC Cancer*, 2008, 8, 229.

Jost MM, Lamerz J, Tammen H, Menzel C, De Meester I, Lambeir AM, Augustyns K, Scharpé S, Zucht HD, Rose H, Jürgens M, Schulz-Knappe P, Budde P. In vivo profiling of

DPP4 inhibitors reveals alterations in collagen metabolism and accumulation of an amyloid peptide in rat plasma. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77(2), 228-37.

Juillerat-Jeanneret L, Aubert JD, Leuenberger P. Peptidases in human bronchoalveolar lining fluid, macrophages, and epithelial cells: dipeptidyl (amino)peptidase IV, aminopeptidase N, and dipeptidyl (carboxy)peptidase (angiotensin-converting enzyme). *J Lab Clin Med*, 1997, 130(6), 603-14.

Karadag F, Karul AB, Cildag O, Yilmaz M, Ozcan H. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung*. 2008, 186(6), 403-9.

Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(3 Pt 1), 737-44.

Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett*, 2008, 270(1), 120-31.

Kelsen SG, Duan X, Ji R, Perez O, Liu C, Merali S. Cigarette smoke induces an unfolded protein response in the human lung: a proteomic approach. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(5), 541-50.

Kim JS, Park HY, Kwon JH, Im EK, Choi DH, Jang YS, Cho SY. The roles of stromelysin-1 and the gelatinase B gene polymorphism in stable angina. *Yonsei Med J*, 2002, 43(4), 473-81.

Kim JY, Yenari MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol*, 2013, 46(1), 1-7.

Kim SY, Lee JH, Huh JW, Ro JY, Oh YM, Lee SD, An S, Lee YS. Cigarette smoke induces Akt protein degradation by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem*, 2011, 286(37), 31932-43.

Kluchová Z, Petrásová D, Joppa P, Dorková Z, Tkácová R. The association between oxidative stress and obstructive lung impairment in patients with COPD. *Physiol Res*, 2007, 56(1), 51-6.

Koch A, Giembycz M, Stirling RG, Lim S, Adcock I, Wassermann K, Erdmann E, Chung KF. Effect of smoking on MAP kinase-induced modulation of IL-8 in human alveolar macrophages. *Eur Respir J*, 2004, 23(6), 805-12.

Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K, Kuznik-Trocha K, Klimek K, Olczyk K. Age- and gender-dependent changes in connective tissue remodeling: physiological

differences in circulating MMP-3, MMP-10, TIMP-1 and TIMP-2 level. *Gerontology*, 2011, 57(1), 44-52.

Kuo WH, Chen JH, Lin HH, Chen BC, Hsu JD, Wang CJ. Induction of apoptosis in the lung tissue from rats exposed to cigarette smoke involves p38/JNK MAPK pathway. *Chem Biol Interact*, 2005, 155(1-2), 31-42.

Lacherade JC, Van De Louw A, Planus E, Escudier E, D'Ortho MP, Lafuma C, Harf A, Delclaux C. Evaluation of basement membrane degradation during TNF-alpha-induced increase in epithelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(1), L134-43.

Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2003, 40(3), 209-94.

Landis BN, Grouzmann E, Monod M, Busso N, Petak F, Spiliopoulos A, Robert JH, Szalay-Quinodoz I, Morel DR, Lacroix JS. Implication of dipeptidylpeptidase IV activity in human bronchial inflammation and in bronchoconstriction evaluated in anesthetized rabbits. *Respiration*, 2008, 75(1), 89-97.

Lapperre TS, Sont JK, van Schadewijk A, Gosman MM, Postma DS, Bajema IM, Timens W, Mauad T, Hiemstra PS; GLUCOLD Study Group. Smoking cessation and bronchial epithelial remodelling in COPD: a cross-sectional study. *Respir Res*, 2007, 8, 85.

Lee IT, Lin CC, Wu YC, Yang CM. TNF-alpha induces matrix metalloproteinase-9 expression in A549 cells: role of TNFR1/TRAF2/PKCalpha-dependent signaling pathways. *J Cell Physiol*, 2010, 224(2), 454-64.

Lee SY, Kim MJ, Kang HG, Yoo SS, Choi YY, Lee WK, Cha SI, Kim CH, Jung TH, Park JY. Polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -9 and -12 genes and the risk of chronic obstructive pulmonary disease in a Korean population. *Respiration*, 2010, 80(2), 133-8.

Li CJ, Ning W, Matthay MA, Feghali-Bostwick CA, Choi AM. MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292(5), L1297-303.

Li W, Xu Y, Zhang Z. Activity of matrix metalloproteinase in airway epithelial cells of COPD patients. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, 25(2), 151-4.

Li W, Xu YJ, Shen HH. Effect of cigarette smoke extract on lipopolysaccha-ride-activated mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured cells. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(12), 1075-81.

Li X, Peng B, Nie C, Shang P, Liu H. Evaluation of the cytotoxicity of cigarette smoke total particulate matter using three in vitro assays and two types of cells. *Toxicol Mech Methods*, 2013, 23(4), 240-6.

Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*, 1976, 17(1), 62-70.

Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, Wu CY, Lee CW, Hsieh HL, Lee IT, Yang CM. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal*, 2009, 21(11), 1652-62.

Liu X, Conner H, Kobayashi T, Kim H, Wen F, Abe S, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Bitterman P, Rennard SI. Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(2), 121-9.

Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*, 2011, 38(1), 191-208.

Lun SW, Wong CK, Ko FW, Hui DS, Lam CW. Increased expression of plasma and CD4+ T lymphocyte costimulatory molecule CD26 in adult patients with allergic asthma. *J Clin Immunol*, 2007, 27(4), 430-7.

Lung Diseases List - Complications in Lung, 2011., www.thehealthmagic.com, pristupljeno 23. veljače 2013.

Luppi F, Aarbiou J, van Wetering S, Rahman I, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione. *Respir Res*, 2005, 6, 140.

MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(4), 258-66.

Maeda S, Haneda M, Guo B, Koya D, Hayashi K, Sugimoto T, Isshiki K, Yasuda H, Kashiwagi A, Kikkawa R. Dinucleotide repeat polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 2001, 60(4), 1428-34.

Maestrelli P, El Messlemani AH, De Fina O, Nowicki Y, Saetta M, Mapp C, Fabbri LM. Increased expression of heme oxygenase (HO)-1 in alveolar spaces and HO-2 in alveolar walls of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(8 Pt 1), 1508-13.

Maestrelli P, Páska C, Saetta M, Turato G, Nowicki Y, Monti S, Formichi B, Miniati M, Fabbri LM. Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients. *Eur Respir J*, 2003, 21(6), 971-6.

Mak JC. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12(4), 368-74.

Malhotra D, Thimmulappa R, Vij N, Navas-Acien A, Sussan T, Merali S, Zhang L, Kelsen SG, Myers A, Wise R, Tuder R, Biswal S. Heightened endoplasmic reticulum stress in the lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the role of Nrf2-regulated proteasomal activity. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(12), 1196-207.

Mao JT, Tashkin DP, Belloni PN, Baileyhealy I, Baratelli F, Roth MD. All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest*, 2003, 124(5), 1724-32.

Marwick JA, Stevenson CS, Giddings J, MacNee W, Butler K, Rahman I, Kirkham PA. Cigarette smoke disrupts VEGF165-VEGFR-2 receptor signaling complex in rat lungs and patients with COPD: morphological impact of VEGFR-2 inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5), L897-908.

Matokanović M, Rumora L, Popović-Grle S, Čepelak I, Čulić O, Barišić K. Association of hsp70-2 (+1267A/G), hsp70-hom (+2437T/C), HMOX-1 (number of GT repeats) and TNF-alpha (+489G/A) polymorphisms with COPD in Croatian population. *Clin Biochem*, 2012, 45(10-11), 770-4.

Matsuno O, Miyazaki E, Nureki S, Ueno T, Ando M, Kumamoto T. Soluble CD26 is inversely Associated with Disease Severity in Patients with Chronic Eosinophilic Pneumonia. *Biomark Insights*, 2007, 1, 201-4.

McCaskill ML, Kharbanda KK, Tuma DJ, Reynolds JD, DeVasure JM, Sisson JH, Wyatt TA. Hybrid malondialdehyde and acetaldehyde protein adducts form in the lungs of mice exposed to alcohol and cigarette smoke. *Alcohol Clin Exp Res*, 2011, 35(6), 1106-13.

McConnell JR, McAlpine SR. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(7), 1923-8.

Medicherla S, Fitzgerald MF, Spicer D, Woodman P, Ma JY, Kapoun AM, Chakravarty S, Dugar S, Protter AA, Higgins LS. p38alpha-selective mitogen-activated protein kinase inhibitor SD-282 reduces inflammation in a subchronic model of tobacco smoke-induced airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324(3), 921-9.

Meiners S, Eickelberg O. What shall we do with the damaged proteins in lung disease? Ask the proteasome! *Eur Respir J*, 2012, 40(5), 1260-8.

Mercer BA, Kolesnikova N, Sonett J, D'Armiento J. Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *J Biol Chem*, 2004, 279(17), 17690-6.

Mercer BA, D'Armiento JM. Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2006, 1(2), 137-50.

Min T, Bodas M, Mazur S, Vij N. Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(6), 577-93.

Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, Yamaguchi K. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1), 116-9.

Miše K. Klinička dijagnostika kronične opstruktivne plućne bolesti. *Medix*, 2006, 67, 79-82.

Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L. Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications. *Curr Opin Pulm Med*, 2011, 17 Suppl 1, S11-9.

Mochida-Nishimura K, Surewicz K, Cross JV, Hejal R, Templeton D, Rich EA, Toossi Z. Differential activation of MAP kinase signaling pathways and nuclear factor-kappaB in bronchoalveolar cells of smokers and nonsmokers. *Mol Med*, 2001, 7(3), 177-85.

Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2009, 4, 19-31.

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*, 1995, 332(18), 1198-203.

Mortaz E, Rad MV, Johnson M, Raats D, Nijkamp FP, Folkerts G. Salmeterol with fluticasone enhances the suppression of IL-8 release and increases the translocation of glucocorticoid receptor by human neutrophils stimulated with cigarette smoke. *J Mol Med (Berl)*, 2008, 86(9), 1045-56.

Mortaz E, Adcock IM, Ito K, Kraneveld AD, Nijkamp FP, Folkerts G. Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor. *Eur Respir J*, 2010, 36(5), 1143-54.

MMP9 matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) [*Homo sapiens* (human)], 2011., www.ncbi.nlm.nih.gov, pristupljeno 05. rujna 2011.

Muscat JE, Kleinman W, Colosimo S, Muir A, Lazarus P, Park J, Richie JP Jr. Enhanced protein glutathiolation and oxidative stress in cigarette smokers. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(4), 464-70.

Müller T, Gebel S. Heme oxygenase expression in Swiss 3T3 cells following exposure to aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis*, 1994, 15(1), 67-72.

Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem*, 1976, 74(2), 466-76.

Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clin Chim Acta*, 1998, 276(2), 173-7.

Nanni S, Melandri G, Hanemaaijer R, Cervi V, Tomasi L, Altimari A, Van Lent N, Tricoci P, Bacchi L, Branzi A. Matrix metalloproteinases in premature coronary atherosclerosis: influence of inhibitors, inflammation, and genetic polymorphisms. *Transl Res*, 2007, 149(3), 137-44.

Navratilova Z, Zatloukal J, Kriegova E, Kolek V, Petrek M. Simultaneous up-regulation of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8, 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 4 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, 2012, 17(6), 1006-12.

Nelissen I, Vandenbroeck K, Fiten P, Hillert J, Olsson T, Marrosu MG, Opdenakker G. Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not a susceptibility factor for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 2000, 105(1), 58-63.

Ning W, Dong Y, Sun J, Li C, Matthay MA, Feghali-Bostwick CA, Choi AM. Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(4), 480-90.

Opstad TB, Pettersen AA, Weiss TW, Akra S, Øvstebø R, Arnesen H, Seljeflot I. Genetic variation, gene-expression and circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(1-2), 113-20.

O'Reilly PJ, Gaggar A, Blalock JE. Interfering with extracellular matrix degradation to blunt inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(3), 242-8.

Orlowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383(1), 1-16.

Ottenheijm CA, Heunks LM, Sieck GC, Zhan WZ, Jansen SM, Degens H, de Boo T, Dekhuijzen PN. Diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(2), 200-5.

Ottenheijm CA, Heunks LM, Li YP, Jin B, Minnaard R, van Hees HW, Dekhuijzen PN. Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(9), 997-1002.

Patel AR, Hurst JR, Wedzicha JA. The potential value of biomarkers in diagnosis and staging of COPD and exacerbations. *Semin Respir Crit Care Med*, 2010, 31(3), 267-75.

Pavičić F, Jakopović M. Definicija, značaj i epidemiologija kronične opstruktivne plućne bolesti. *Medix*, 2006, 67, 62-3.

Peters DG, Kassam A, St Jean PL, Yonas H, Ferrell RE. Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke*, 1999, 30(12), 2612-6.

Petruzzelli S, Puntoni R, Mimotti P, Pulerà N, Baliva F, Fornai E, Giuntini C. Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156(6), 1902-7.

Piesiak P, Brzecka A, Kosacka M, Passowicz-Muszyńska E, Dyła T, Jankowska R. Concentrations of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Merkur Lekarski*, 2011, 31(185), 270-3.

Pons AR, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Barceló B, Fuster A, Agustí AG. Decreased macrophage release of TGF-beta and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2005, 26(1), 60-6.

Poppek D, Grune T. Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(1-2), 173-84.

Praticò D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha-III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(6), 1709-14.

Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 686, 12-27.

Rahman I, van Schadewijk AA, Crowther AJ, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, De Boer WI. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(4), 490-5.

Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*, 2006, 28(1), 219-42.

Ramage L, Jones AC, Whelan CJ. Induction of apoptosis with tobacco smoke and related products in A549 lung epithelial cells in vitro. *J Inflamm (Lond)*, 2006, 3, 3.

Reilly JJ Jr, Chen P, Sailor LZ, Wilcox D, Mason RW, Chapman HA Jr. Cigarette smoking induces an elastolytic cysteine proteinase in macrophages distinct from cathepsin L. *Am J Physiol*, 1991, 261(2 Pt 1), L41-8.

Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J*, 1998, 335(Pt 3), 637-42.

Remes ST, Delezuch W, Pulkki K, Pekkanen J, Korppi M, Matinlauri IH. Association of serum-soluble CD26 and CD30 levels with asthma, lung function and bronchial hyper-responsiveness at school age. *Acta Paediatr*, 2011, 100(9), e106-11.

Renda T, Baraldo S, Pelaia G, Bazzan E, Turato G, Papi A, Maestrelli P, Maselli R, Vatrella A, Fabbri LM, Zuin R, Marsico SA, Saetta M. Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur Respir J*, 2008, 31(1), 62-9.

Rennard SI. Cigarette smoke in research. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(5), 479-80.

Roth M. Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12(4), 375-80.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(2), 320-44.

Rueff-Barroso CR, Trajano ET, Alves JN, Paiva RO, Lanzetti M, Pires KM, Bezerra FS, Pinho RA, Valenca SS, Porto LC. Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. *Med Sci Monit*, 2010, 16(7), BR218-26.

Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barisić K, Cepelak I, Grubisić TZ. Levels changes of blood leukocytes and intracellular signalling pathways in COPD patients with respect to smoking attitude. *Clin Biochem*, 2008(a), 41(6), 387-94.

Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Grubišić Žanić T, Čepelak I. Reduction in peripheral blood leukocyte heat shock proteins 27 and 70 expression in chronic obstructive pulmonary disease. *Croatica Chemica Acta*, 2008(b), 81(1), 73-80.

Rumora L, Žanić Grubišić T. MAP kinase signalling cascades in cell proliferation and apoptosis. U: Biochemistry and immunology intersections. Markotić A (ur.), Trivandrum, Research Signpost, 2008, str. 151-171.

Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26(5), 602-9.

Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 1998, 3(4), 228-36.

Santos MC, Oliveira AL, Viegas-Crespo AM, Vicente L, Barreiros A, Monteiro P, Pinheiro T, Bugalho De Almeida A. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*, 2004, 9(6), 461-9.

Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, Altose MD, Bailey WC, Buist AS. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(2 Pt 1), 381-90.

Schirmer H, Basso da Silva L, Teixeira PJ, Moreira JS, Moreira AL, Simon D. Matrix metalloproteinase gene polymorphisms: lack of association with chronic obstructive pulmonary disease in a Brazilian population. *Genet Mol Res*, 2009, 8(3), 1028-34.

Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*, 2000, 117(3), 684-94.

Sekhon BS. Matrix metalloproteinases – an overview. *Research and Reports in Biology*, 2010, 2010(1), 1-20.

Shaker SB, von Wachenfeldt KA, Larsson S, Mile I, Persdotter S, Dahlbäck M, Broberg P, Stoel B, Bach KS, Hestad M, Fehniger TE, Dirksen A. Identification of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by measurement of plasma biomarkers. *Clin Respir J*, 2008, 2(1), 17-25.

Shang F, Taylor A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1), 5-16.

Shapiro SD. Smoke gets in your cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(5), 481-2.

Sharp FR, Massa SM, Swanson RA. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci*, 1999, 22(3), 97-9.

Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 2001, 29(1), 15-32.

Shi GP, Munger JS, Meara JP, Rich DH, Chapman HA. Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem*, 1992, 267(11), 7258-62.

Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, Sasaguri Y. Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett*, 1999, 455(1-2), 70-4.

Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2), 143-9.

Shringarpure R, Davies KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic Biol Med*, 2002, 32(11), 1084-9.

Simpson JL, McDonald VM, Baines KJ, Oreo KM, Wang F, Hansbro PM, Gibson PG. Influence of age, past smoking, and disease severity on TLR2, neutrophilic inflammation, and MMP-9 levels in COPD. *Mediators Inflamm*, 2013, 462934.

Slebos DJ, Kerstjens HA, Rutgers SR, Kauffman HF, Choi AM, Postma DS. Haem oxygenase-1 expression is diminished in alveolar macrophages of patients with COPD. *Eur Respir J*, 2004, 23(4), 652-3.

Slebos DJ, Ryter SW, van der Toorn M, Liu F, Guo F, Baty CJ, Karlsson JM, Watkins SC, Kim HP, Wang X, Lee JS, Postma DS, Kauffman HF, Choi AM. Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(4), 409-17.

Somborac Bačura A, Buljević S, Rumora L, Čulić O, Detel D, Pancirov D, Popović-Grle S, Varljen J, Čepelak I, Žanić Grubišić T. Decreased soluble dipeptidyl peptidase IV activity as a potential serum biomarker for COPD. *Clin Biochem*, 2012, 45(15), 1245-50.

Somborac Bačura A, van der Toorn M, Franciosi L, Slebos DJ, Žanić Grubišić T, Bischoff R, van Oosterhout AJ. Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells. *Exp Physiol*, 2013, 98(1), 316-25.

Srivastava PK. New jobs for ancient chaperones. *Sci Am*, 2008, 299(1), 50-5.

Tagawa Y, Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Okamura M, Yao J, Kitamura M. Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP). *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(1), 50-9.

Takahashi H, Ishidoh K, Muno D, Ohwada A, Nukiwa T, Kominami E, Kira S. Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Am Rev Respir Dis*, 1993, 147(6 Pt 1), 1562-8.

Taraseviciene-Stewart L, Voelkel NF. Molecular pathogenesis of emphysema. *J Clin Invest*, 2008, 118(2), 394-402.

Tayebjee MH, Lip GY, Blann AD, Macfadyen RJ. Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. *Thromb Res*, 2005, 115(3), 205-10.

Tesfaigzi Y, Myers OB, Stidley CA, Schwalm K, Picchi M, Crowell RE, Gilliland FD, Belinsky SA. Genotypes in matrix metalloproteinase 9 are a risk factor for COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2006, 1(3), 267-78.

To Y, Dohi M, Matsumoto K, Tanaka R, Sato A, Nakagome K, Nakamura T, Yamamoto K. A two-way interaction between hepatocyte growth factor and interleukin-6 in tissue invasion of lung cancer cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(2), 220-6.

Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9), 663-74.

Torres-Ramos YD, García-Guillen ML, Olivares-Corichi IM, Hicks JJ. Correlation of Plasma Protein Carbonyls and C-Reactive Protein with GOLD Stage Progression in COPD Patients. *Open Respir Med J*, 2009, 3, 61-6.

Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 2012, 122(8), 2749-55.

Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*, 2000, 96(8), 2673-81.

Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002, 37(6), 375-536.

van der Toorn M, Slebos DJ, de Bruin HG, Leuvenink HG, Bakker SJ, Gans RO, Koëter GH, van Oosterhout AJ, Kauffman HF. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007(a), 292(5), L1211-8.

van der Toorn M, Smit-de Vries MP, Slebos DJ, de Bruin HG, Abello N, van Oosterhout AJ, Bischoff R, Kauffman HF. Cigarette smoke irreversibly modifies glutathione in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007(b), 293(5), L1156-62.

van der Toorn M, Rezayat D, Kauffman HF, Bakker SJ, Gans RO, Koëter GH, Choi AM, van Oosterhout AJ, Slebos DJ. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(1), L109-14.

van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, 2004, 59(8), 713-21.

Van Der Velden VH, Naber BA, Van Hal PT, Overbeek SE, Hoogsteden HC, Versnel MA. Peptidase activities in serum and bronchoalveolar lavage fluid from allergic asthmatics--comparison with healthy non-smokers and smokers and effects of inhaled glucocorticoids. *Clin Exp Allergy*, 1999, 29(6), 813-23.

van Diemen CC, Postma DS, Siedlinski M, Blokstra A, Smit HA, Boezen HM. Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts. *Respir Res*, 2011, 12, 57.

van Rijt SH, Keller IE, John G, Kohse K, Yildirim AÖ, Eickelberg O, Meiners S. Acute cigarette smoke exposure impairs proteasome function in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(9), L814-23.

Varljen J, Mijandrušić Sinčić B, Batičić L, Varljen N, Detel D, Lekić A. Clinical relevance of the serum dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in adult patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Croatica Chemica Acta*, 2005, 78(3), 427-32.

Verdoes M, Florea BI, Menendez-Benito V, Maynard CJ, Witte MD, van der Linden WA, van den Nieuwendijk AM, Hofmann T, Berkers CR, van Leeuwen FW, Groothuis TA, Leeuwenburgh MA, Ovaa H, Neefjes JJ, Filippov DV, van der Marel GA, Dantuma NP, Overkleeft HS. A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labeling proteasomes in vitro and in vivo. *Chem Biol*, 2006, 13(11), 1217-26.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995, 184(1), 39-51.

Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'accardi P, Bousquet J, Bonsignore G. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(6), 1945-50.

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011, 334(6059), 1081-6.

Wang NP, Lim PS, Chen TT, Thien LM, Wang TH, Hsu WM. Smoking is associated with alterations of blood thiol-group related antioxidants in patients on hemodialysis. *Nephron*, 2002, 92(4), 772-9.

Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(5), 562-70.

Wiggs BR, Bosken C, Paré PD, James A, Hogg JC. A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145(6), 1251-8.

Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J*, 2005, 26(5), 835-45.

Willyard C. Diagnosis: To catch a killer. *Nature*, 2012, 489(7417), S8-9.

Wolf M, Albrecht S, Märki C. Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(6-7), 1185-98.

Wu CH, Lin HH, Yan FP, Wu CH, Wang CJ. Immunohistochemical detection of apoptotic proteins, p53/Bax and JNK/FasL cascade, in the lung of rats exposed to cigarette smoke. *Arch Toxicol*, 2006, 80(6), 328-36.

Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(1), 187-95.

Yildirim E, Kormi I, Başoğlu OK, Gürgün A, Kaval B, Sorsa T, Buduneli N. Periodontal health and serum, saliva matrix metalloproteinases in patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *J Periodontal Res*, 2013, 48(3), 269-75.

Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A; Respiratory Failure Research Group in Japan. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest*, 2004, 125(2), 626-32.

Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Bessonova SV, Okada Y. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ*, 2005, 12(11), 1390-7.

Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 1999(a), 99(14), 1788-94.

Zhang B, Henney A, Eriksson P, Hamsten A, Watkins H, Ye S. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2-13.1. *Hum Genet*, 1999(b), 105(5), 418-23.

Zhao J, Xie J, Xu Y, Zhang Z, Zhang N. Expression of heat stress protein 70 mRNA in patients with chronic obstructive pulmonary disease and its significance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, 25(1), 20-3.

Zhou M, Huang SG, Wan HY, Li B, Deng WW, Li M. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and the susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Han population of south China. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(10), 1481-4.

Zhu G, Warren L, Aponte J, Gulsvik A, Bakke P, Anderson WH, Lomas DA, Silverman EK, Pillai SG; International COPD Genetics Network (ICGN) Investigators. The SERPINE2

gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease in two large populations. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(2), 167-73.

Zucker S, Lysik RM, Malik M, Bauer BA, Caamano J, Klein-Szanto AJ. Secretion of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by human lung cancer cell lines and revertant cell lines: not an invariant correlation with metastasis. *Int J Cancer*, 1992, 52(3), 366-71.

8. PRILOZI

PRILOG A: Popis kratica

ANOVA	jednosmjerna analiza varijance (eng. *One Way Analysis of Variance*)
AP-1	aktivacijski protein 1 (eng. *activator protein-1*)
Apaf-1	apoptozni faktor 1 koji aktivira proteaze (eng. *apoptotic protease activating factor-1*)
ATF	aktivirajući transkripcijski faktor (eng. *activating transcription factor*)
AUC	površina ispod ROC krivulje (eng. *area under the ROC curve*)
BHT	butilirani hidroksitoluen
BiP	protein koji veže imunoglobuline (eng. *binding immunoglobulin protein*)
BSA	goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*)
CAD	DNaza aktivirana kaspazama (eng. *caspase-activated DNase*)
CAT	test za procjenu KOPB-a (eng. *COPD Assessment Test*)
CHOP	protein homologan proteinu koji se veže za CCAAT / pojačivač (eng. *CCAAT / enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein*)
CRP	C-reaktivni protein
CSE	ekstrakt dima cigareta (eng. *Cigarette Smoke Extract*)
dATP	deoksiadenozin-5'-trifosfat
dCTP	deoksicitidin-5'-trifosfat
dGTP	deoksigvanozin-5'-trifosfat
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt (eng. *death inducing signaling complex*)
dNTP	deoksinukleozid-trifostat
DMSO	dimetil-sulfoksid
DPPIV	dipeptidil peptidaza IV
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
dTTP	deoksitimidin-5'-trifosfat
E1	ubikvitin-aktivirajući enzim
E2	ubikvitin-konjugirajući enzimi
E3	ubikvitin-proteinske ligaze
EGR-1	protein rasta ranog odgovora 1 (eng. *early growth response-1*)
eIF2α	eukariotski faktor 2α inicijacije translacije (eng. *eukaryotic translation initiation factor 2α*)
ELISA	enzimska imunokemijska analiza (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*)
ER	endoplazmatski retikulum

ERAD	razgradnja povezana s ER-om (eng. *ER-associated degradation*)
ERK	kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (eng. *extracellular signal-regulated kinases*)
FADD	protein koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (eng. *Fas-associated death domain*)
FEV_1	forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi (eng. *forced expired volume in 1 second*)
fMLP	formilmetionil-leucil-fenilalanin
FVC	forsirani vitalni kapacitet (eng. *forced vital capacity*)
GADD34	protein 34 kojeg induciraju zaustavljanje rasta i oštećenje DNA (eng. *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*)
GCLC	katalitička podjedinica glutamat-cisteinske ligaze (eng. *glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit*)
GM-CSF	faktor koji stimulira rast granulocitno-makrofagnih kolonija (eng. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)
GRP	protein reguliran glukozom (eng. *glucose-regulated protein*)
GSH	reducirani glutation
HGF	faktor rasta hepatocita (eng. *hepatocyte growth factor*)
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HO	hem-oksigenaza
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*)
HSE	elementi toplinskog šoka (eng. *heat shock elements*)
HSF	trankripcijski faktori toplinskog šoka (eng. *heat shock trancription factors*)
HSP	proteini toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*)
ICAD	inhibitor CAD-a (eng. *inhibitor of CAD*)
IL	interleukin
IRE1	enzim 1 kojemu je potreban inozitol (eng. *inositol requiring enzyme 1*)
JNK	kinaze koje fosforiliraju N-kraj c-Jun-a (eng. *c-Jun N-terminal kinases*)
KOPB	kronična opstrukcijska plućna bolest
LC/MS	tekućinska kromatogafija - spektrometrija masa (eng. *liquid chromatography - mass spectrometry*)
LDH	laktat dehidrogenaza
LPS	bakterijski lipopolisaharid

MAPK	proteinske kinaze aktivirane mitogenima (eng. *mitogen-activated protein kinases*)
MAPKK	kinaza MAPK (eng. *MAPK kinase*)
MAPKKK	kinaza kinaze MAPK (eng. *MAPK kinase kinase*)
MCP-1	monocitni kemotaktični peptid 1 (eng. *monocyte chemotactic peptide-1*)
MDA	malondialdehid
MK	proteinske kinaze koje se aktiviraju putem MAPK (eng. *MAPK-activated protein kinases*)
MMP	metaloproteinaza matriksa (eng. *matrix metalloproteinase*)
mMRC	Izmijenjeno britansko medicinsko istraživačko vijeće (eng. *Modified British Medical Research Council*)
MNK	kinaze koje ulaze u interakciju s MAPK (eng. *MAPK-interacting kinases*)
MSK	mitogenima i stresom aktivirane kinaze (eng. *mitogen- and stress-activated kinases*)
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolijev bromid
NF-κB	jezgrin faktor κB (eng. *nuclear factor-κB*)
Nrf2	jezgrin faktor 2 sličan eritroidnom faktoru 2 (eng. *nuclear factor erytroid 2-related factor 2*)
ns	nestimulirane stanice
PBS	otopina soli puferirana fosfatom (eng. *phosphate buffer saline*)
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)
PEG-OPFP	esteri polietilenglikolnih derivata aktivirani pentafluorofenilom
PERK	kinaza ER-a slična proteinskoj kinazi koja se aktivira dvolančanom RNA (PKR) (eng. *double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase*)
PMA	forbol-miristat-acetat
PMN	polimorfonuklearni leukociti
PP1C	proteinska fosfataza 1C (eng. *protein phosphatase 1C*)
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (eng. *restriction fragment length polymorphism)*
ROC	krivulja ROC (eng. *receiver operating characteristic*)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (eng. *reactive oxygen species*)
RSK	ribosomalne S6 kinaze veličine ~90 kDa (eng. *~90-kDa ribosomal S6 kinases*)
RTK	tirozin-kinazni receptori

SAPK	proteinske kinaze aktivirane stresom (eng. *stress-activated protein kinases*)
SDS-PAGE	diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
sDPPIV	topivi oblik DPPIV (eng. *soluble DPPIV*)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*)
Sp-1	stimulirajući protein 1 (eng. *stimulating protein-1*)
t-PA	tkivni aktivator plazminogena
TBA	tiobarbiturna kiselina
TEMED	tetrametil etilen diamin
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteinaza matriksa
TNB	5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina
TNF	faktor tumorske nekroze (eng. *tumor necrosis factor*)
TRAIL	ligand sličan TNF-u koji potiče apoptozu (eng. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*)
u-PA	urokinaza
UPR	odgovor na razmotane proteine (eng. *unfolded protein response*)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)
XBP-1	protein 1 koji se veže na DNA u području X-sloga (eng. *X-box DNA binding protein 1*)

PRILOG B: Rezultati sekvenciranja uzoraka DNA

Pravilan odabir početnica i prisustvo polimorfnog mjesta unutar fragmenta kojeg omeđuju početnice potvrđeni su sekvenciranjem uzoraka (tvrtka Macrogen Inc.) koji su sadržavali umnožene PCR produkte CC i TT genotipa za -1562 C/T polimorfizam, odnosno AA i GG genotipa za Q279R polimorfizam.

PCR produkti CC i TT genotipa sekvencirani su u oba smjera (prema naprijed i u obrnutom smjeru). Restrikcijsko mjesto označeno je plavom bojom, dok je polimorfno mjesto označeno zelenom bojom.

CC genotip (prema naprijed):

ATATCAGCATTGGGCTGGGAGCCATGGCTCATGCCCGTAATCCTAGCACT
TTGGGAGGCCAGGTGGGCAGATCACTTGAGTCAGAAGTTCGAAACCAGCC
TGGTCAACGTAGTGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAAATTTAGC
CAGGCGTGGTGGCGCACGCCTATAATACCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGC
AGGAGAATTGCTTGAACCCGGGAGGCAGATGTTGCAGTGAGCCGAGATCA
CGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGATACTACACCCCCCAAAA
ATAAAATAAAATAAATAAATACAACTTTTTGAGTTGTTAGCAGGTTTTTC
CCAAATAGGGCTTTGAAGAAGGTGAATATAGACCCTGCCCGATGCCGTGG
GCATTAGGAAGATC

CC genotip (u obrnutom smjeru):

AAGAATTTAACTTCTACTTCTTCAGCCCTATTTGGGAAACCTGCTAACAA
CTCAAAAAGTTGTATTTATTTATTTTATTTTATTTTTGGGGGGTGTAGTA
TCACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAATGGCGTGATCTCGGCTCACTGC
AACATCTGCCTCCCGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGT
AGCTGGTATTATAGGCGTGCGCCACCACGCCTGGCTAAATTTTTTGTATT
TTTAGTAGAGATGGGGTTTCACTACGTTGACCAGGCTGGTTTCGAACTTC
TGACTCAAGTGATCTGCCCACCTGGCCTCCCAAAGTGCTAGGATTACGGG
CATGAGCCATGGCGCCCGGCCCAATAAGCTGTATTTAAAGGGCCTACTAG
TTTGCCAGGCCAA

TT genotip (prema naprijed):

TTAGTCTTCATTCGGGCTGGAGACATGGCTCATGCCCGTAATCCTAGCAC
TTTGGGAGGCCAGGTGGGCAGATCACTTGAGTCAGAAGTTCGAAACCAGC
CTGGTCAACGTAGTGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAAATTTAG
CCAGGCGTGGTGGCGCATGCCTATAATACCAGCTACTCGGGAGGCTGAGG
CAGGAGAATTGCTTGAACCCGGGAGGCAGATGTTGCAGTGAGCCGAGATC
ACGCCACTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGATACTACACCCCCCAAA
AATAAAATAAAATAAATAAATACAACTTTTTGAGTTGTTAGCAGGTTTTT
CCCAAATAGGGCTTTGAAGAAGGTGAATATAGACCCTGCCCGATGCCGGG
GCTCTAGGAAGAGT

TT genotip (u obrnutom smjeru):

GTCACTTTTACTTCTTGTAAGCCCTATTTGGGAAAACCTGCTAACAACTC
AAAAAGTTGTATTTATTTATTTTATTTTATTTTTGGGGGGTGTAGTATCA
CTCTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGTGATCTCGGCTCACTGCAAC
ATCTGCCTCCCGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGC
TGGTATTATAGGCATGCGCCACCACGCCTGGCTAAATTTTTTGTATTTTT
AGTAGAGATGGGGTTTCACTACGTTGACCAGGCTGGTTTCGAACTTCTGA
CTCAAGTGATCTGCCCACCTGGCCTCCCAAAGTGCTAGGATTACGGGCAT
GAGCCATGGCGCCCGGCCCAATAAGCTGTATTTAAAGGGCCTACAGGTCC
CAGGCAAACGTGGCCTCAGGCCTGTGGGCCGGGGGCTGGGGGGGCGATGC
AGGATCATGTATGAAGCCGGGCGAGTAATATTTGAAGTGAAAGCTCAAGC
CTCTGGAAATCCTACTGGGGTGACCGATTGAAACTTCCCCAACCATAATC
AGATTGTTATACCTGCTACTATAAATTGACTTAG

PCR produkti AA i GG genotipa sekvencirani su samo u obrnutom smjeru jer reakciju prema naprijed nije bilo moguće očitati zbog smještaja polimorfnog mjesta blizu samog početka PCR produkta. Restrikcijsko mjesto označeno je plavom bojom.

AA genotip (u obrnutom smjeru):

GTGCAGGAGGCTGTCCGGTCGTAGTTGGCGGTGGTGGCGCACCAGCGGTA
GCCGTCGGAGCGACCGTCCGTGGTGCAGGCGGAGTAGGATTGGCCTTGGA
AGATGAATGGAAACTGGCAGGGTTTCCCATCAGCATTGCCGTCCTGGGTG
TAGAGCCTGGGGCGAGTACTCCTCGCAGGACGAAAGACAGGAGAATTGCT
GGTGCCGGGATGCCGATGTGGCAATGAGAGTATATTTCGCCTAGGGAGTG
GGTCTGGGGGAGGTGTGTTACGGC

GG genotip (u obrnutom smjeru):

ATTTTGAGTAGCTGTCGGTCGTAGTTGGCGGTGGTGGCGCACCAGCGGTA
GCCGTCGGAGCGACCGTCCGTGGTGCAGGCGGAGTAGGATTGGCCTTGGA
AGATGAATGGAAACTGGCAGGGTTTCCCATCAGCATTGCCGTCCCGGGTG
TAGAGTCCTGGGGCGAGAACATCTCTCCTCGGAGGCTGAGGCAGGAGAAT
TGCTGGAACCCGGGAGGCCGGCGGGCAAGTGAGCCTATATCTCCCCTATG
CACGGGGTCCTGGGGGAGTGACTGAGAGGCTCCCCCCTTCTTAAGACAGA
GAGCTGCGCTACTGGTTCCGAGTTGGCACAATTTTTTCCCTGATGGGCTTTGC

PRILOG C: Znanstveni radovi autorice zastupljeni u Current Contents bazi

Ovaj prilog sadrži dva originalna znanstvena rada autorice ove doktorske disertacije objavljena u časopisima koji su zastupljeni u Current Contents bazi, a koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom radu:

1. **Somborac Bačura, Anita**; van der Toorn, Marco; Franciosi, Lorenza; Slebos, Dirk-Jan; Žanić-Grubišić, Tihana; Bischoff, Rainer; van Oosterhout, Antoon J. M. **Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells**. *Experimental Physiology*, 2013, 98(1), 316-325.

2. **Somborac Bačura, Anita**; Buljević, Sunčica; Rumora, Lada; Čulić, Ognjen; Detel, Dijana; Pancirov, Dolores; Popović-Grle, Sanja; Varljen, Jadranka; Čepelak, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana. **Decreased soluble dipeptidyl peptidase IV activity as a potential serum biomarker for COPD**. *Clinical Biochemistry*, 2012, 45(15), 1245-50.

9. ŽIVOTOPIS

ŽIVOTOPIS AUTORICE

Anita Somborac Bačura rođena je 25. listopada 1982. godine u Bihaću, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu pohađala je u Bihaću, Đakovu i Zagrebu. Godine 2001. završila je 1. gimnaziju u Zagrebu i upisala Farmaceutsko-biokemijski fakultet, studij Medicinska biokemija. Tijekom cijelog dodiplomskog studija primala je stipendiju Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta za osobito nadarene redovite studente. Diplomski rad "*Mijeloperoksidaza u neutrofilima: povezanost s dobi i hormonskom terapijom*", pod vodstvom prof. dr. sc. Mirne Sučić, obranila je 27. veljače 2007. godine i time stekla zvanje *diplomirani inženjer medicinske biokemije* (izjednačeno s *magistra medicinske biokemije*).

Od 01. srpnja 2007. godine zaposlena je kao znanstvena novakinja - asistentica na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, na projektu "Molekularni mehanizmi patogeneze kronične opstrukcijske bolesti pluća". Akademske godine 2007./08. upisala je poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti, modul Medicinsko-biokemijske znanosti.

Pripravnički staž za zdravstvene djelatnike odradila je tijekom 2007./08. godine na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb te je 2009. godine položila stručni ispit pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi.

Tijekom 2008. i 2010. (ukupno 4 mjeseca) boravila je na znanstvenom usavršavanju na University Medical Center Groningen u Groningenu, Nizozemska. Stručno se usavršavala na jednom međunarodnom tečaju trajnog usavršavanja i jednoj ljetnoj školi.

Prvi je autor 2 originalna znanstvena rada zastupljena u Current Contents bazi te je koautor 12 kongresnih priopćenja, od čega je 2 priopćenja usmeno izlagala, a na međunarodnim skupovima bila je nagrađena za 3 posterska izlaganja. Koautor je jednog sveučilišnog nastavnog teksta.

Članica je Hrvatske komore medicinskih biokemičara, Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju te European Respiratory Society.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koji su zastupljeni u Current Contents bazi:

1. **Somborac Bačura, Anita**; van der Toorn, Marco; Franciosi, Lorenza; Slebos, Dirk-Jan; Žanić-Grubišić, Tihana; Bischoff, Rainer; van Oosterhout, Antoon J. M. **Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells**. *Experimental Physiology*, 2013, 98(1), 316-325.
2. **Somborac Bačura, Anita**; Buljević, Sunčica; Rumora, Lada; Čulić, Ognjen; Detel, Dijana; Pancirov, Dolores; Popović-Grle, Sanja; Varljen, Jadranka; Čepelak, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana. **Decreased soluble dipeptidyl peptidase IV activity as a potential serum biomarker for COPD**. *Clinical Biochemistry*, 2012, 45(15), 1245-1250.

Priopćenja (posterska ili usmena) na međunarodnim ili domaćim znanstvenim skupovima:

1. **Somborac Bačura, Anita**; Rumora, Lada; Šribar, Dora; Popović-Grle, Sanja; Čepelak, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana. **MMP-9 and TIMP-1 concentrations in plasma of patients with chronic obstructive pulmonary disease**. *Biochemia Medica*, 2012, A147.
2. Sučić, Mirna; **Somborac Bačura, Anita**; Žanić-Grubišić, Tihana; Ljubić, Nives; Perković, Leila; Ivanović, Dunja; Županić-Krmek Dubravka. **Telomerase, IMP-3 and hScrib in A549 alveolar epithelial cancer cell line**. *Cytopathology - Abstracts of the 37th European Congress of Cytology, Supplement 1*, 2012, 62-63.
3. **Somborac Bačura, Anita**; Rumora, Lada; Meštrić, Ines; Vukelić, Martina; Matokanović, Mirela; Pancirov, Dolores; Popović-Grle, Sanja; Čepelak, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana. **MMP-9 concentration and MMP-9 gene polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease**. *FEBS 3+ Meeting "From molecules to life and back" Book of Abstracts*, 2012, 237.
4. Matokanović, Mirela; Grdić Rajković, Marija; Križanović, Maja; Volarić, Andrea; **Somborac Bačura, Anita**; Čepelak, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana; Rumora, Lada. **Frequency of Q192R, L55M and -108C>T polymorphisms of pon1 and S311C polymorphism of pon2 gene in chronic obstructive pulmonary disease: The Croatian study**. *FEBS 3+ Meeting "From molecules to life and back" Book of Abstracts*, 2012, 230.
5. **Somborac, Anita**; Pancirov, Dolores; Ostojić, Sunčica; Detel, Dijana; Varljen, Jadranka; Čepelak, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana. **Proinflammatory role of dipeptidyl peptidase IV in patients with chronic obstructive pulmonary disease**. *FEBS Journal: Abstracts of the 36th FEBS Congress "Biochemistry for Tomorrow's Medicine"*, 2011, 305.
6. **Somborac, Anita**; Rumora, Lada; Miletić, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana. **Cigarette smoke induces differential activation of MAP kinase signaling pathways in alveolar epithelial cells**. *HDBMB 2010 Book of Abstracts*, 2010, 147.

7. **Somborac, Anita**; van der Toorn, Marco; Franciosi, Lorenza; Slebos, Dirk-Jan; Verdoes, Martijn; Florea, Bogdan; Overkleeft, Herman; Žanić Grubišić, Tihana; Bischoff, Rainer; van Oosterhout, Antoon. **Cigarette smoke disturbs protein turnover inside airway epithelial cells**. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine: Meeting Abstracts*, 2010, A3539.
8. **Somborac, Anita**; Ostojić, Sunčica; Detel, Dijana; Pancirov, Dolores; Varljen, Jadranka; Čepelak, Ivana. **Aktivnost dipeptidil peptidaze IV kod bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti**. *Biochemia Medica*, 2009, S172-S173.
9. **Somborac, Anita**; van der Toorn, Marco; Franciosi, Lorenza; Slebos, Dirk-Jan; Verdoes, Martijn; Florea, Bogdan; Overkleeft, Herman; Žanić Grubišić, Tihana; Bischoff, Rainer; van Oosterhout, Antoon. **Cigarette smoke - induced protein damage: role of the proteasome**. *Bronchitis 8: Obstructive Lung Diseases from Conception to Old Age*, 2009, 92.
10. **Somborac, Anita**. **Uloga proteasoma u degradaciji proteina oštećenih dimom cigareta**. *Biochemia Medica*, 2009, A9-A10.
11. **Somborac, Anita**; Rumora, Lada; Čepelak, Ivana; Žanić Grubišić, Tihana. **Effects of cigarette smoke extract on induction of TIMP-1, MMP-9 and MMP-2 in human A549 cell line**. *Book of Abstracts of the HDBMB 2008, Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation*, 2008, 132.
12. **Somborac, Anita**; Sučić, Mirna. **Effects of hormonal therapy on myeloperoxidase expression and activity**. *EMBO Meeting on Cellular Signaling and Molecular Medicine: Program & Abstracts*, 2008, 133-134.

Sveučilišna skripta:

1. Žanić Grubišić, Tihana; Barišić, Karmela; Rumora, Lada; Grdić Rajković, Marija; Matokanović, Mirela; **Somborac, Anita**. **Vježbe iz Biokemije 2 za studente studija Farmacije i Medicinske biokemije**. Rumora, Lada (ur.), Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2010.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorska disertacija**
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

MOLEKULARNI MEHANIZMI PATOGENEZE KRONIČNE OPSTRUKCIJSKE PLUĆNE BOLESTI

Anita Somborac Bačura

SAŽETAK

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) najučestalija je kronična respiracijska bolest s progresivnim tijekom. Temeljni uzroci KOPB-a uključuju pušenje cigareta, čimbenike okoline te gensku predispoziciju. Dosadašnje spoznaje o razvoju upale, oksidacijskom stresu i neravnoteži proteaza i antiproteaza nisu dostatne za objašnjenje nastanka i progresije bolesti. Ovo istraživanje pokazalo je da ekstrakt dima cigareta u A549 alveolarnim epitelnim stanicama uzrokuje oksidacijska oštećenja staničnih lipida i proteina, što bi moglo voditi do gubitka važnih funkcija stanice, rezultirajući smrću stanice. Nakupljanje oštećenih proteina u stanicama vodi do aktivacije ER stresnog odgovora u vidu povećanja razine fosforiliranog eIF2α i smanjenja *de novo* sinteze proteina. Smanjena sinteza proteina vjerojatno pridonosi povećanju koncentracije slobodnih aminokiselina unutar stanica zajedno s razgradnjom proteina oštećenih dimom cigareta putem ubikvitin-proteasomalnog sustava. Iako se ER stresni odgovor obično povezuje s povećanom aktivnosti proteasoma, dim cigareta uzrokuje značajno smanjenje kaspazne, tripsinske i kimotripsinske aktivnosti proteasoma, što ih čini nedovoljno učinkovitima u procesu uklanjanja oštećenih proteina. Kao dio staničnog odgovora na stres dolazi i do porasta ekspresije šaperonskih proteina HSP32 i HSP27, što nismo pokazali i za HSP70. Također dolazi do promjena u MAPK signalnim putovima: značajno raste razina aktivirane p38, ne dolazi do aktivacije ERK, a aktivaciju JNK nismo uspjeli detektirati. Nadalje, rezultati su pokazali da A549 stanice ne sadrže MMP-9, ali pod utjecajem ekstrakta dima cigareta s vremenom u medij pojačano otpuštaju MMP-2, a TIMP-1 otpuštaju u manjoj količini, što bi moglo pridonijeti ukupnoj neravnoteži proteaza i antiproteaza. U bazalnim uvjetima polimorfonuklearni leukociti (PMN) bolesnika s KOPB-om otpuštaju značajno više MMP-9 u odnosu na zdrave kontrole. Stimulacijom PMN zdravih kontrola ekstraktom dima cigareta povećava se otpuštanje MMP-9, dok ista stimulacija u bolesnika s KOPB-om ne izaziva dodatno povećanje visoke razine otpuštanja MMP-9, što dokazuje kroničnu aktivaciju PMN bolesnika i njihovu moguću ulogu u razgradnji izvanstaničnog matriksa u plućima. Sistemska neravnoteža proteaza i antiproteaza u bolesnika s KOPB-om očituje se povećanom koncentracijom MMP-9 u plazmi. Analiza ROC krivulja pokazala je vrlo dobru dijagnostičku točnost za koncentraciju MMP-9, što je čini dobrim biljegom za razlikovanje bolesnika i zdravih osoba. Ispitivanje učestalosti polimorfizama *MMP9* gena (-1562 C/T i $(CA)_n$ dinukleotidna ponavljanja u promotorskoj regiji te Q279R u egzonu 6) pokazalo je da nema značajnih razlika između bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika, kao niti povezanosti koncentracije MMP-9 s genotipovima ispitanika. U serumu bolesnika s KOPB-om, kod kojih je dokazana sistemska upala (povećani ukupni leukociti, neutrofili i CRP), nalazimo smanjenu aktivnost DPPIV, proteaze koja bi mogla pridonositi razvoju upale. S obzirom na dokazanu vrlo dobru dijagnostičku točnost, ovaj enzim bi se također mogao koristiti kao učinkovit biokemijski pokazatelj KOPB-a.

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

Rad sadrži: 204 stranice, 52 slike, 17 tablica i 238 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi: kronična opstrukcijska plućna bolest, epitel, dim cigareta, ER stres, ubikvitin-proteasomalni sustav, HSP, MAPK, MMP-9, TIMP-1, DPPIV

Mentor: **Dr. sc. Tihana Žanić Grubišić**, *redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Ocjenjivači: **Dr. sc. Lada Rumora**, *redoviti profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Dr. sc. Ognjen Čulić, *znanstveni savjetnik, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Dr. sc. Sanja Popović-Grle, *docent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*
Rad prihvaćen: 12. srpnja 2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Doctoral thesis**
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOGENESIS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Anita Somborac Bačura

SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the most common chronic respiratory disease with a progressive course. The principal causes of COPD include cigarette smoking, environmental factors and genetic predisposition. Current knowledge about the development of inflammation, oxidative stress and protease-antiprotease imbalance is not sufficient to explain the origin and progression of the disease. In this study we found that cigarette smoke extract causes oxidative damage to cellular lipids and proteins in A549 alveolar epithelial cells, which could lead to the loss of important cell functions, eventually resulting in cell death. The accumulation of damaged proteins in cells leads to the activation of ER stress response in the form of increased levels of phosphorylated eIF2α and reduced *de novo* protein synthesis. It is likely that reduced protein synthesis contributes to the increase in the level of free amino acids in the cells, together with the degradation of proteins damaged by cigarette smoke inside the ubiquitin-proteasome system. ER stress response is usually associated with increased proteasomal activity; however, cigarette smoke causes a significant reduction in caspase-, trypsin- and chymotrypsin-proteasomal activities, making the proteasome inefficient in the process of removing damaged proteins. As a part of the cellular stress response, we observed an increase in the expression of chaperone proteins HSP32 and HSP27, which was not shown for HSP70. Likewise, we noticed the changes in MAPK signaling pathways: a significant increase in the level of activated p38, no activation of ERK and undetectable activation of JNK. Furthermore, the results showed that A549 cells do not produce MMP-9, but after a while treatment with the cigarette smoke extract increases the release of MMP-2 in the medium and decreases the release of TIMP-1, which probably contributes to the overall protease-antiprotease imbalance. In basal conditions polymorphonuclear leukocytes (PMN) of patients with COPD release significantly much more MMP-9 compared to healthy controls. Stimulation of PMN of healthy controls with cigarette smoke extract increases the release of MMP-9, while in patients with COPD no further increase over the high secretion rate was found, suggesting the chronic activation of PMN of patients with COPD and their possible role in the degradation of extracellular matrix in the lungs. Systemic protease-antiprotease imbalance in plasma of patients with COPD is manifested by increased concentration of MMP-9. ROC curve analysis showed a very good diagnostic accuracy for concentration of MMP-9, making it a good biomarker for distinguishing patients from healthy individuals. Testing the frequency of *MMP9* gene polymorphisms (-1562 C/T and $(CA)_n$ dinucleotide repeat in the promoter region, and Q279R in exon 6) showed no significant difference between patients with COPD and healthy subjects, and no correlation of MMP-9 concentration with subjects' genotypes. In sera of patients with COPD, with the observed systemic inflammation (increased total leukocytes, neutrophils and CRP), we found a decrease in activity of DPPIV, a protease that could be contributing to the development of inflammation. As showing a very good diagnostic accuracy, this enzyme could also be used as an effective biochemical marker of COPD.

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

Thesis includes: 204 pages, 52 figures, 17 tables and 238 references. Original is in Croatian language.
Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, epithelium, cigarette smoke, ER stress, ubiquitin-proteasome system, HSP, MAPK, MMP-9, TIMP-1, DPPIV

Menthor: **Tihana Žanić Grubišić, Ph.D.** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*
Reviewers: **Lada Rumora, Ph.D.** *Full Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*
Ognjen Čulić, Ph.D. *Senior Scientist, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.*
Sanja Popović-Grle, Ph.D. *Assistant Professor, School of Medicine, University of Zagreb.*
Thesis accepted: 12th July 2013