Sistemski biljezi oksidacijskih i upalnih promjena u kroničnoj opstrukcijskoj plućnoj bolesti

Milevoj Kopčinović, Lara

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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:163:424637

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

Lara Milevoj Kopčinović

SISTEMSKI BILJEZI OKSIDACIJSKIH I UPALNIH PROMJENA U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Lada Rumora

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lara Milevoj Kopčinović

SYSTEMIC BIOMARKERS OF OXIDATIVE AND INFLAMMATORY ALTERATIONS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Professor Lada Rumora, PhD

Zagreb, 2017.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti u znanstvenom području Biomedicina i zdravstvo, polje Farmacija, grana Medicinska biokemija.

Doktorski rad je izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Lade Rumora u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Uloga stresnog proteina Hsp70 u imunosno-upalnom odgovoru kod kronične opstrukcijske plućne bolesti“ (IP-2014-09-1247).



Ovaj doktorski rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-1247.

Mentorici prof. dr. sc. Ladi Rumora zahvaljujem na korisnim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.
Zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Vrkić na pomoći prilikom izrade dijela ovog rada.

Hvala mojim dečkima, Noi i Danijelu.
Hvala mojoj obitelji.

SAŽETAK

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je složeni poremećaj koji zahvaća pluća, ali i sistemski odjeljak. Naše se istraživanje temeljilo na hipotezi da je u bolesnika s KOPB-om prisutna sistemska upala i sistemski oksidacijski stres. Sukladno tome, cilj ovog istraživanja bio je istražiti sistemske pokazatelje oksidacijskih i upalnih promjena u bolesnika sa stabilnim KOPB-om te ispitati povezanost sistemskih antioksidansa s poremećajem funkcije pluća i biljezima sistemske upale. Ispitali smo i dijagnostičku učinkovitost biljega sistemskog oksidacijskog stresa u razlikovanju zdravih i oboljelih od KOPB-a.

Sistemski biljezi oksidacijskog stresa (albumin, transferin, ceruloplazmin, ukupni bilirubin, slobodne tiolne skupine, malondialdehid (MDA), paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1), te ekspresija i aktivacija unutarstaničnih signalnih molekula Hsp27, Hsp70, ERK, JNK i p38) određeni su u 106 bolesnika sa stabilnim KOPB-om i 45 zdravih ispitanika. Ispitane su i njihove povezanosti s biljezima sistemske upale (CRP, fibrinogen, ukupni leukociti), pušenjem i pokazateljima funkcije pluća (FEV_1 i FEV_1/FVC).

Bolesnici s KOPB-om su imali povišene koncentracije ceruloplazmina i MDA, snižene koncentracije albumina, transferina i tiola, te snižene obje ispitane aktivnosti PON1. Koncentracije ukupnog bilirubina nisu se razlikovale usporedbom ispitivanih skupina. Ceruloplazmin je pokazao pozitivnu korelaciju s CRP-om i fibrinogenom. Albumin i transferin su pokazali negativnu korelaciju s CRP-om, te pozitivnu korelaciju sa slobodnim tiolima. Transferin je negativno korelirao s fibrinogenom. Jedini pokazatelj povezan s funkcijom pluća bio je MDA. Usporedbom pušača, bivših pušača i nepušača iz skupine bolesnika s KOPB-om nisu nađene razlike u koncentracijama promatranih biljega oksidacijskog stresa i upale. Povišene koncentracije ceruloplazmina su najsnažniji prediktor prisutnosti KOPB-a. Model koji uključuje ceruloplazmin, albumin, MDA i arilesteraznu aktivnost PON1 te biljege sistemske upale pokazao je najbolju dijagnostičku učinkovitost u predviđanju KOPB-a (AUC (95%CI) = 0,96 (0,92 – 0,99)). Predloženi bi model mogao ispravno predvidjeti prisutnost KOPB-a u 89% bolesnika. Također, naši su rezultati ukazali da je razina ekspresije Hsp27 i Hsp70 u leukocitima periferne bila je najniža u pušača s KOPB-om. Ekspresija svih ispitivanih MAPK (ERK, JNK i p38) u perifernim leukocitima bolesnika s KOPB-om nije se razlikovala u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Aktivacija ERK bila je značajnija kod zdravih i bolesnih nepušača, dok je aktivacija JNK i p38 bila najizraženija u pušača s KOPB-om.

Rezultati su ukazali da prisutnost bolesti i pušenje utječu na ispitane unutarstanične signalne molekule. Bolje razumijevanje ovih molekularnih mehanizama moglo bi pomoći u dijagnozi i pronalaženju novih terapijskih meta za KOPB. Dijagnostičke karakteristike predloženog modela koji kombinira koncentracije biljega sistemske upale i sistemskog oksidacijskog stresa ukazuju da bi se on mogao koristiti kao vrijedan alat u razlikovanju zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om.

Ključne riječi: KOPB; sistemski oksidacijski stres; sistemska upala; MAPK, Hsp

SUMMARY

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex disorder affecting the lungs and the systemic compartment. We hypothesized that systemic inflammation and systemic oxidative stress are present in patients with COPD. Therefore, we aimed to investigate markers of systemic oxidative and inflammatory alterations in patients with stable COPD, and to test the association of systemic antioxidants with indicators of lung function and systemic inflammation. The diagnostic accuracy of systemic oxidative stress parameters in distinguishing between healthy subjects and patients with COPD was also evaluated.

Materials and methods: Systemic oxidative stress markers (albumin, transferrin, ceruloplasmin, total bilirubin, thiols, malondialdehyde (MDA), paraoxonase and arylesterase activity of paraoxonase 1 (PON1), and the expression and activation of intracellular signalling molecules Hsp27, Hsp70, ERK, JNK i p38) were assessed in 106 stable COPD patients and 45 healthy subjects. Their association with systemic inflammatory markers (CRP, fibrinogen, total leukocytes), smoking status and lung function parameters (FEV_1 i FEV_1/FVC) was investigated.

Results: Higher ceruloplasmin and MDA concentrations, and lower albumin, transferrin, thiols and PON1 activities (paraoxonase and arylesterase) were found in patients with COPD. Total bilirubin concentrations were similar in the studied groups. Ceruloplasmin showed a positive correlation with CRP and fibrinogen. Albumin and transferrin showed a negative correlation with CRP, and a positive corelation with thiols. Transferrin negatively correlated with fibrinogen. Only MDA showed an association with pulmonary function. No differences were found comparing concentrations of oxidative stress and inflammatory markers between COPD patients subdivided according to their smoking status. Ceruloplasmin was the strongest single predictor of COPD. The model combining ceruloplasmin, albumin, MDA, arylesterase PON1 activity, and markers of systemic inflammation demonstrated very good diagnostic performances (AUC (95%CI) = 0,96 (0,92 – 0,99)). The proposed model correctly identifies 89% of patients with COPD. In addition, our results showed that the decrease in expression of peripheral blood leukocytes' Hsp27 and Hsp70 was the most prominent in COPD smokers. Expression levels of all three MAPKs investigated was not altered in leukocytes of COPD patients compared to healthy subjects. However, ERK activation was stimulated in healthy

and COPD non-smokers, while JNK and p38 activation was the most pronounced in COPD smokers.

Conclusions: Our results showed that COPD and smoking affect the intracellular signalling pathways investigated. Improved understanding of these molecular mechanisms could help identify novel targets for diagnosis and therapeutic interventions in COPD. Diagnostic characteristics of the proposed model, obtained by combining markers of systemic inflammation and systemic oxidative stress, suggest its potential value as an additional tool in COPD diagnosis.

Key words: COPD; systemic oxidative stress; systemic inflammation; MAPK; Hsp

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 Pregled kronične opstrukcijske plućne bolesti 1

1.1.1 Definicija bolesti 1

1.1.2 Kliničke manifestacije 2

1.1.3 Dijagnostički kriteriji i procjena bolesti 3

1.1.4 Epidemiologija i značaj KOPB-a 9

1.1.5 Tijek bolesti i čimbenici rizika 12

1.1.6 Patogeneza, patofiziologija i patologija KOPB-a 16

1.1.7 Liječenje KOPB-a 25

1.2 Sistemski učinci kronične opstrukcijske plućne bolesti 27

1.3 Biljezi oksidacijskih i upalnih promjena 30

1.3.1 Protein-kinaze aktivirane mitogenima 30

1.3.2 Proteini toplinskog šoka 33

1.3.3 Proteinske tiolne skupine 38

1.3.4 Albumin 39

1.3.5 Transferin 40

1.3.6 Ceruloplazmin 41

1.3.7 Ukupni bilirubin 42

1.3.8 Malondialdehid 43

1.3.9 Paraoksonaza 1 44

2 HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA 45

3 EKSPERIMENTALNI DIO 47

3.1 Ispitanici 47

3.2 Uzorci 48

3.3 Metode 49

3.3.1 Određivanje hematoloških pretraga 49

3.3.2 Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina 49

3.3.3 Određivanje koncentracije fibrinogena 49

3.3.4 Određivanje koncentracije lipidnih parametara 49

3.3.5 Određivanje koncentracije pokazatelja oksidacijskog stresa 50

3.3.6 Određivanje aktivnosti PON1 u serumu 51

3.3.7 Izolacija leukocita i priprema lizata 51

3.3.8 Određivanje koncentracije proteina u lizatu leukocita 52

3.3.9 Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i Western blot analiza 53
3.4 Statistička analiza 56
4 REZULTATI 59
4.1 Opće karakteristike ispitanika 59
4.2 Koncentracije općih biljega sistemske upale 62
4.3 Koncentracije biljega sistemskog oksidacijskog stresa 64
4.4 Utjecaj pušenja i KOPB-a na biljege sistemskog oksidacijskog stresa i upale 67
4.5 Povezanost biljega sistemskog oksidacijskog stresa s poremećajem plućne funkcije 69
4.6 Povezanost antioksidacijskih biljega sa sistemskom upalom i oksidacijskim stresom 70
4.7 Diskriminacijske sposobnosti biljega sistemskog oksidacijskog stresa 72
4.8 Modeli za predviđanje prisutnosti bolesti 74
4.9 Promjene u ekspresiji proteina toplinskog šoka 76
4.10 Promjene u aktivaciji MAPK 77
5 RASPRAVA 80
6 ZAKLJUČCI 95
7 LITERATURA 97
8 POPIS KRATICA 118
9 ŽIVOTOPIS 122
10 POPIS RADOVA 123

1 UVOD

1.1 Pregled kronične opstrukcijske plućne bolesti

1.1.1 Definicija bolesti

Svjetska strategija za dijagnozu, liječenje i prevenciju kronične opstrukcijske plućne bolesti (engl. *Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease*) definira kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (KOPB) kao poremećaj kojeg karakteriziraju perzistentno i progresivno ograničenje protoka zraka kroz dišne putove i neprimjeren kroničan upalni odgovor u dišnim putovima i plućnom parenhimu (1). Iako je definicija Svjetske inicijative za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (GOLD, engl. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) danas široko prihvaćena i implementirana u različite nacionalne i međunarodne preporuke za dijagnozu i liječenje KOPB-a, ona u potpunosti ne odražava kompleksnost i heterogenost ove bolesti (2-4).

Kronična upala, koja se smatra izvorištem KOPB-a, nastaje kao posljedica udisanja štetnih čestica i plinova. U plućima ona rezultira temeljnim patološkim promjenama KOPB-a: bolešću perifernih i centralnih dišnih putova i destrukcijom plućnog parenhima. Patološke promjene koje zahvaćaju spomenute odjeljke pluća dovode do pretjerane sekrecije mukusa, ograničenja protoka zraka i hiperinflacije, poremećaja u izmjeni plinova i plućne hipertenzije (3). Međutim, posljedice neprimjerenog upalnog odgovora nisu ograničene samo na pluća, već se odražavaju i na sistemski odjeljak. Sistemska kronična upala povezuje se s nastankom sistemskih posljedica bolesti u bolesnika s KOPB-om. Sistemski učinci bolesti u sprezi s mogućim egzacerbacijama ne samo da doprinose ozbiljnosti KOPB-a, već utječu i na heterogenost njene prezentacije i ishod (5-7).

Kronična opstrukcijska plućna bolest obilježena je izrazitim interindividualnim varijacijama obzirom na kliničke manifestacije, mehanizme nastanka i tijek bolesti (8). Stoga se danas smatra da KOPB nastaje kao posljedica međudjelovanja genske osnove pojedinca i utjecaja okolišnih čimbenika (1,3).

1.1.2 Kliničke manifestacije

Tipične kliničke manifestacije KOPB-a uključuju zaduhu, kronični kašalj i iskašljavanje. Bolesnici vrlo često podcjenjuju prisutne simptome, čak i u uznapredovaloj bolesti, stoga je jasno zašto se obično javljaju liječniku tek u kasnijim stadijima bolesti, odnosno u dobi od oko četrdesete do pedesete godine (8,9).

Kronični kašalj s iskašljavanjem je prvi simptom koji se pojavljuje u većine bolesnika. U početku se javlja sporadično, a zatim postaje svakodnevna pojava. Zaduha se smatra temeljnim simptomom KOPB-a. Ona je kroničnog i progresivnog karaktera, a karakteristično je za KOPB da se pogoršava fizičkom aktivnošću. Ima značajan utjecaj na kvalitetu života i obično uzrokuje tjeskobu kod bolesnika, što ih upućuje da potraže medicinsku pomoć. Svi navedeni simptomi mogu prethoditi razvoju ograničenja protoka zraka, ali mogu i izostati iz kliničke slike KOPB-a. Manje učestali simptomi su teško disanje i stezanje u prsima, dok se umor, gubitak težine, anoreksija i depresija javljaju u kasnijim (ozbiljnim) stadijima bolesti (1,5,8).

Klinička sumnja na prisutnost KOPB-a je opravdana u osoba starijih od 40 godina koje pokazuju simptome zaduhe i kroničnog kašlja s iskašljavanjem, a u anamnezi imaju pozitivnu povijest izloženosti rizičnim čimbenicima bolesti i/ili pozitivnu obiteljsku anamnezu (1,7). Konačna potvrda dijagnoze KOPB-a donosi se temeljem dokaza o prisutnosti ograničenja protoka zraka kroz dišne putove spirometrijom.

Naše se razumijevanje KOPB-a u posljednjih desetak godina značajno promijenilo. Opstrukcija dišnih putova kvantificirana spirometrijom vrlo slabo korelira sa simptomima prisutnim u individualnih bolesnika. Stoga se danas o KOPB-u govori kao o kompleksnom i heterogenom poremećaju. Pojam „kompleksan“ se odnosi na (brojne) plućne i sistemske komponente bolesti čija dinamična interakcija u vremenu nije linearna, a pojam „heterogeni“ se odnosi na činjenicu da sve te komponente nisu jednako prisutne u svim pojedinim bolesnicima u određenoj vremenskoj točki (10,11).

Kako bi se što vjernije opisala kompleksnost KOPB-a, moderni pristup bolesti zasniva se na grupiranju bolesnika s KOPB-om u skupine sa sličnim (ili istim) fenotipom bolesti. Termin fenotip se u kliničkom smislu odnosi na različite kliničke pojavnosti bolesti, a definira karakteristike KOPB-a ili kombinacije karakteristika i komorbiditeta koje opisuju razlike

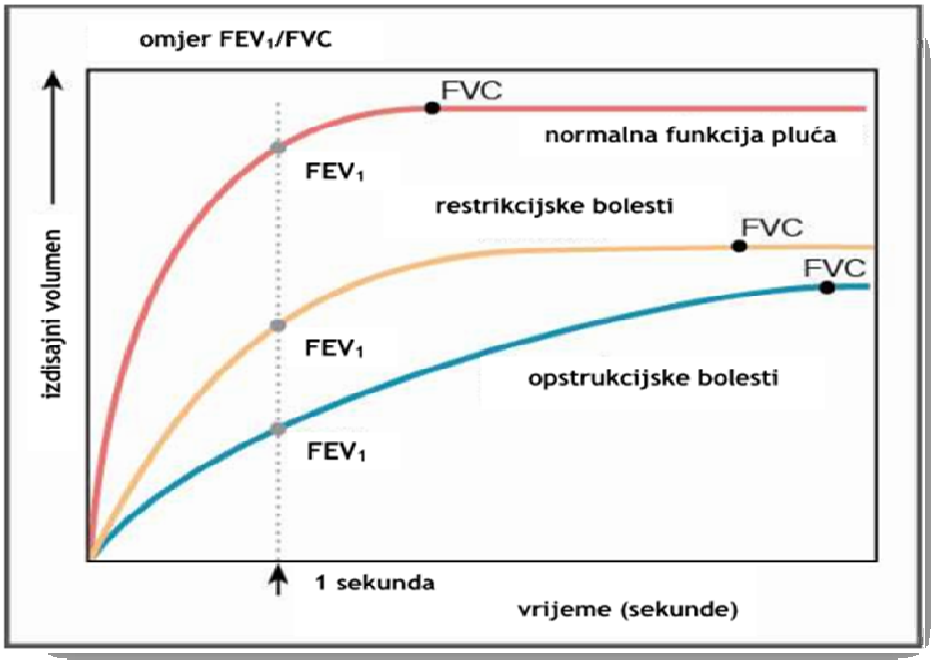
između pojedinaca s KOPB-om, te se mogu povezati s klinički važnim ishodima kao što su simptomi, egzacerbacije, odgovor na terapiju, progresija bolesti ili smrtnost od KOPB-a. Iako konsenzus oko broja i definicije pojedinih fenotipova bolesti još nije postignut, prepoznavanje pojedinačnih fenotipova omogućit će razlikovanje skupina bolesnika sa zajedničkim simptomima i kliničkim manifestacijama, a time i sličnim terapijskim pristupom i prognozom (12,13).

1.1.3 Dijagnostički kriteriji i procjena bolesti

Temeljne sastavnice dijagnostičkog postupka uključuju anamnezu, klinički pregled i nalaz spirometrije.

Anamneza bolesnika s KOPB-om obuhvaća: (a) procjenu izloženosti bolesnika rizičnim čimbenicima; (b) isključivanje prisutnosti alergija, astme ili drugih respiracijskih bolesti; (c) utvrđivanje preboljenih respiracijskih infekcija u djetinjstvu; (d) utvrđivanje pozitivne obiteljske anamneze za KOPB ili druge kronične respiracijske bolesti; (e) utvrđivanje prisutnosti razvoja tipičnih simptoma KOPB-a; (f) utvrđivanje prisutnosti prethodnih egzacerbacija bolesti ili hospitalizacija zbog respiracijskih uzroka; (g) utvrđivanje prisutnosti komorbiditeta i (h) procjenu ukupnog učinka bolesti na kvalitetu života bolesnika. Iako važan u općoj skrbi za bolesnika, klinički pregled nije presudan za donošenje dijagnoze KOPB-a.

Konačna se dijagnoza KOPB-a postavlja isključivo temeljem nalaza spirometrije. Spirometrija se smatra zlatnim standardom za točno i ponovljivo određivanje funkcije pluća. Radi se o fiziološkom testu kojim se mjeri volumen izdahnutog zraka u vremenu, nakon maksimalnog udisaja. Iz dobivenog spirograma može se očitati nekoliko pokazatelja funkcije pluća, od kojih su za dijagnozu i klasifikaciju KOPB-a najvažniji: a) forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi (FEV_1, engl. *forced expiratory volume in one second*), b) forsirani vitalni kapacitet (FVC, engl. *forced vital capacity*), te c) omjer FEV_1/FVC (Slika 1). Vrijednosti FEV_1 i FVC se izražavaju u litrama ili kao udio predviđene vrijednosti za pojedinca. Normalne vrijednosti omjera FEV_1/FVC su 70 – 80%.



Slika 1. Prikaz spirograma.

Kao dijagnostički test za KOPB, spirometrija zadovoljava sljedeće kriterije: pouzdana je, jednostavna, neinvazivna, sigurna i jeftina metoda za otkrivanje ograničenja protoka zraka kroz dišne putove i procjenu njegove reverzibilnosti (14,15). Dijagnostički kriterij kojim se dokazuje prisutnost ireverzibilnog ograničenja protoka zraka kroz dišne putove (opstrukcije) u KOPB-u je fiksna vrijednost omjera $FEV_1/FVC < 70$ % (1).

Nakon utvrđivanja prisutnosti opstrukcijskog obrasca, pristupa se testu bronhodilatacije. Prema GOLD smjernicama, težina ograničenja protoka zraka u dišnim putovima kod bolesnika s KOPB-om može se klasificirati u četiri kategorije, sukladno vrijednostima FEV_1 dobivenim spirometrijskom analizom nakon testa bronhodilatacije (Tablica 1). Vrijednosti FEV_1 nakon testa bronhodilatacije uspoređuju se s predviđenim vrijednostima ovisno o spolu, dobi, tjelesnoj visini i težini bolesnika. Takva je procjena bolesti prihvaćena u kliničkom okruženju i na njoj se temelje sva dosadašnja epidemiološka istraživanja KOPB-a (1).

Tablica 1. Klasifikacija težine ograničenja protoka zraka u bolesnika s KOPB-om

STADIJ BOLESTI	SPIROMETRIJSKI PARAMETRI, % predviđene vrijednosti nakon testa bronhodilatacije
Kod bolesnika s FEV_1 / FVC < 70 %	
GOLD 1: blaga	$FEV_1 \geq 80$
GOLD 2: umjerena	$50 \leq FEV_1 < 80$
GOLD 3: teška	$30 \leq FEV_1 < 50$
GOLD 4: vrlo teška	$FEV_1 < 30$

Tablica preuzeta iz (1). Datum pristupa: 3. svibnja 2017.

Dostupni dokazi ukazuju da FEV_1 slabo korelira sa simptomima i narušenom kvalitetom života kod bolesnika s KOPB-om. Osim toga, vrijednosti FEV_1 fiziološki opadaju sa starenjem. Upotreba fiksnog omjera FEV_1/FVC za definiciju ograničenja protoka zraka rezultira učestalijom dijagnozom KOPB-a u starije populacije, a podcjenjuje prisutnost bolesti u odrasle populacije mlađe od 45 godina (pogotovo ako se radi o blagom obliku). Upravo je zato predložena alternativna granična vrijednost omjera FEV_1/FVC za dijagnozu KOPB-a. Radi se o vrijednosti pete percentile donje granične vrijednosti omjera FEV_1/FVC za odgovarajuću referentnu populaciju (LLN, engl. *lower limit of normal*). Danas se obje granične vrijednosti smatraju jednakovrijednima, ali zbog svoje jednostavnosti i neovisnosti o referentnim vrijednostima, te zbog činjenice da se koristio u brojnim kliničkim ispitivanjima na kojima se temelje dokazi iz kojih proizlaze današnje smjernice za liječenje, fiksni se kriterij smatra dostatnim dokazom ograničenja protoka zraka u dijagnostici KOPB-a (1,16-18).

FEV_1 je neizostavan, ali i nedovoljan za karakterizaciju kompleksnosti KOPB-a. Nekoliko je ograničenja koja treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata. FEV_1 proizlazi iz dvije odrednice, veličine centralnih dišnih putova i elastičnosti pluća. Nasuprot tome, FEV_1 ne odražava poremećaje u perifernim dišnim putovima i parenhimu pluća, komponentama važnim u patologiji KOPB-a. Nadalje, FEV_1 ne korelira sa sistemskim učincima bolesti (10,17). Jasno je da FEV_1 ne može poslužiti kao jedini parametar za opis heterogenosti KOPB-a.

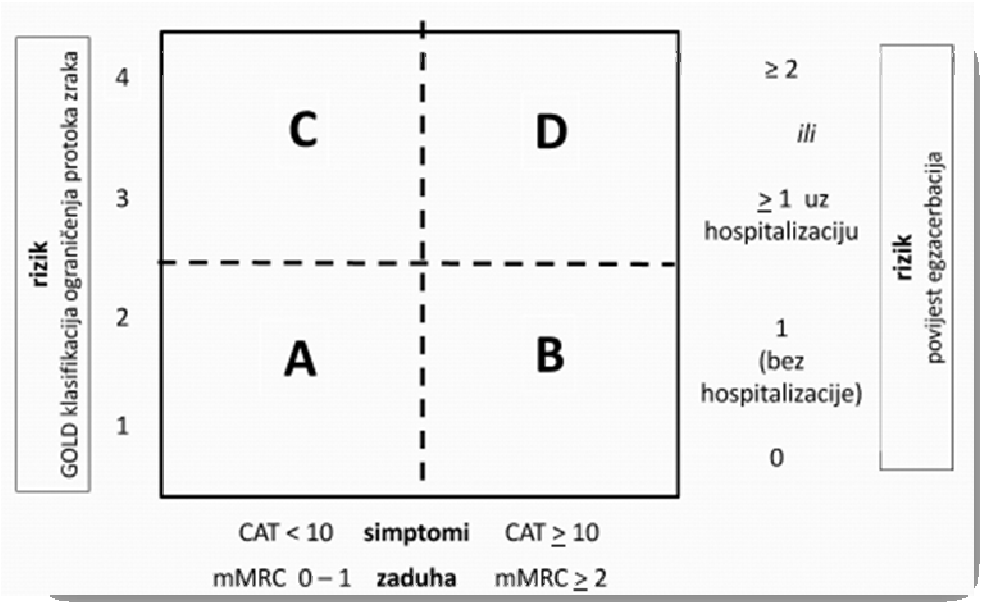
Moderni pristup KOPB-u temelji se na ukupnoj (kombiniranoj) procjeni bolesti (engl. *combined assessment*). Ovaj multidimenzijski pristup obuhvaća procjenu težine bolesti, procjenu njenog utjecaja na ukupno zdravstveno stanje i kvalitetu života bolesnika te utvrđivanje rizika od budućih neželjenih ishoda kao što su egzacerbacije bolesti, mogućnost hospitalizacije ili smrtni ishod (1,16).

Intenzitet prisutnih simptoma u bolesnika s KOPB-om procjenjuje se koristeći specifično dizajnirane anketne upitnike. GOLD smjernica preporuča upotrebu dva validirana upitnika: test za procjenu KOPB-a (CAT, engl. *COPD Assessment Test*) i kontrolni upitnik za KOPB (CCQ, engl. *COPD Control Questionnaire*). Ovi jednostavni i pouzdani upitnici pogodni su za rutinsku kliničku uporabu, a cilj im je brojčano vrednovati intenzitet simptoma (CAT), odnosno omogućiti kliničko praćenje bolesnika s KOPB-om (CCQ). U nedostatku CAT upitnika koristi se nešto stariji upitnik za brojčano vrednovanje intenziteta zaduhe u bolesnika s KOPB-om pod nazivom modificirani upitnik Britanskog vijeća za medicinska istraživanja (mMRC, engl. *Modified British Medical Research Council Questionnaire*). CAT učinak ≥ 10 ukazuje na visoki intenzitet prisutnih simptoma u bolesnika s KOPB-om. Učinak mMRC ≥ 2 ukazuje na značajnu zaduhu kod bolesnika (1,4,16).

Egzacerbacija KOPB-a je akutni događaj obilježen naglim pogoršanjem respiracijskih simptoma u bolesnika, koje nadilazi dnevne varijacije i dovodi do nužne promjene u terapiji i/ili hospitalizacije. Najbolji prediktor učestalih egzacerbacija je podatak o prethodno liječenim egzacerbacijama. Općenito se može reći da se rizik od egzacerbacija značajno povećava u skupinama bolesnika s teškim i vrlo teškim KOPB-om (1).

Obzirom da se KOPB javlja u osoba srednjih godina s dugom pušačkom poviješću, jasno je da su uz KOPB prisutne i druge bolesti (koje se skupno nazivaju komorbiditetima) povezane s pušenjem i/ili starenjem. Prisutnost komorbiditeta značajno utječe ne samo na kvalitetu života bolesnika s KOPB-om, već i na progresiju bolesti i preživljenje bolesnika. Učestalost komorbiditeta u bolesnika s KOPB-om procjenjuje se na 65-81% (19). Kardiovaskularne bolesti smatraju se najvažnijim komorbiditetom povezanim s KOPB-om. Zajednički etiopatogenetski mehanizam oba poremećaja je sistemska upala, a njeno se porijeklo pripisuje zajedničkim rizičnim čimbenicima među kojima se ubrajaju pušenje, sjedilački način života te starija životna dob (20). Poremećaj funkcije skeletnih mišića je najopsežnije istraživan komorbiditet KOPB-a. Čini se da su razvoj i progresija poremećaja funkcije skeletnih mišića usko povezani s prisutnošću sistemske upale u KOPB-u (21). Od

ostalih značajnih komorbiditeta ističu se normocitna anemija, osteoporoza, depresija i anksiozni poremećaji, dijabetes i metabolički sindrom, te karcinom pluća. Kako komorbiditeti doprinose ukupnoj ozbiljnosti bolesti, njihovo rutinsko prepoznavanje i liječenje značajno utječe na poboljšanje ishoda bolesti (1,16).



Slika 2. Prikaz kombinirane procjene KOPB-a.

Preuzeto i prilagođeno iz (1).

Kombinirana procjena klasificira bolesnike s KOPB-om u četiri skupine (Slika 2):

- Skupina A predstavlja bolesnike niskog rizika s manje izraženim simptomima. Obično se radi o bolesnicima koji prema spirometrijskim značajkama pripadaju skupinama GOLD 1 ili 2, s do jednom egzacerbacijom godišnje te niskim intenzitetom simptoma (mMRC stupanj 0 - 1, CAT učinak < 10).

- Skupinu B čine bolesnici niskog rizika s izraženijim simptomima. Radi se o bolesnicima koji prema spirometrijskim značajkama pripadaju skupinama GOLD 1 ili 2, s do jednom egzacerbacijom godišnje te CAT učinkom ≥ 10 ili mMRC stupnjem ≥2.

- Skupinu C čine bolesnici visokog rizika s manje izraženim simptomima. Radi se o bolesnicima koji se prema spirometrijskim značajkama svrstavaju u GOLD 3 ili 4 skupinu, s

više od 2 egzacerbacije godišnje (ili jednom hospitalizacijom zbog egzacerbacije), CAT učinkom < 10 ili mMRC stupnjem 0 - 1.

- U skupinu D svrstavaju se bolesnici visokog rizika s izraženijim simptomima. Radi se o bolesnicima koji se prema spirometrijskim značajkama pripadaju GOLD 3 ili 4 skupini, s više od 2 egzacerbacije godišnje te CAT učinkom ≥ 10 ili mMRC stupnjem ≥ 2.

Kombinirani pristup KOPB-u, u sprezi s procjenom prisutnih komorbiditeta, odražava kompleksnost i heterogenost bolesti učinkovitije od jednodimenzijske procjene ograničenja protoka zraka spirometrijom i predstavlja temelj za individualiziranu terapiju (1,16).

Posljednjih je godina predloženo i nekoliko alternativnih multidimenzijskih indeksa kojima se nastoje obuhvatiti kompleksna plućna patofiziologija bolesti te njeni sistemski učinci i komorbiditeti, a istovremeno pojednostavniti procjena stanja bolesnika, prognoza bolesti i planiranje terapije u kliničkoj praksi (17,22). Od značajnijih multidimenzijskih indeksa valja istaknuti BODE (engl. *Body mass index, Obstruction, Dyspnea, Exercise capacity*) indeks, koji se temelji na elementima indeksa tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*), opstrukcije dišnih putova (FEV_1), zaduhe (engl. *dyspnea*) i sposobnosti tjelovježbe (engl. *exercise capacity*), redom prihvaćenim prognostičkim čimbenicima u KOPB-u. Iako je početno razvijen kao prognostički biljeg za procjenu smrtnosti kod bolesnika s KOPB-om, pokazalo se da je superioran u usporedbi s jednodimenzijskom procjenom bolesti temeljenom na FEV_1, te da se njime može procijeniti i rizik od hospitalizacije i odgovor bolesnika na terapijske intervencije. BODE se smatra referentnim multidimenzijskim indeksom, najbolje je validiran u kliničkoj praksi i najviše se koristi. Njegov je nedostatak što ne odražava u potpunosti kliničku heterogenost KOPB-a (16,22).

1.1.4 Epidemiologija i značaj KOPB-a

KOPB je, nakon ishemijske bolesti srca, cerebrovaskularnih bolesti te infekcija donjeg respiracijskog trakta, četvrti vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, s 3,3 milijuna umrlih godišnje (23). Bolest je to sa značajnim ekonomskim i socijalnim posljedicama koje pokazuju trend stalnog porasta. Procjenjuje se da će kroz nekoliko desetljeća KOPB postati jedan od najvećih problema javnog zdravstva, ne samo zbog izravnih troškova liječenja, već i zbog utjecaja na radnu sposobnost bolesnika i općenito na kvalitetu života. Rastući značaj bolesti, kako u industrijaliziranim tako i u zemljama u razvoju, izravna je posljedica starenja svjetske populacije i kontinuirano visokog trenda pušenja u svijetu (1,24,25).

Unatoč tome, pokazatelji značaja bolesti, među koje ubrajamo prevalenciju, pobol, smrtnost i socioekonomske posljedice, nisu prikladno ispitani. Vrlo je vjerojatno da dostupni podaci značajno podcjenjuju njen stvarni značaj (26,27).

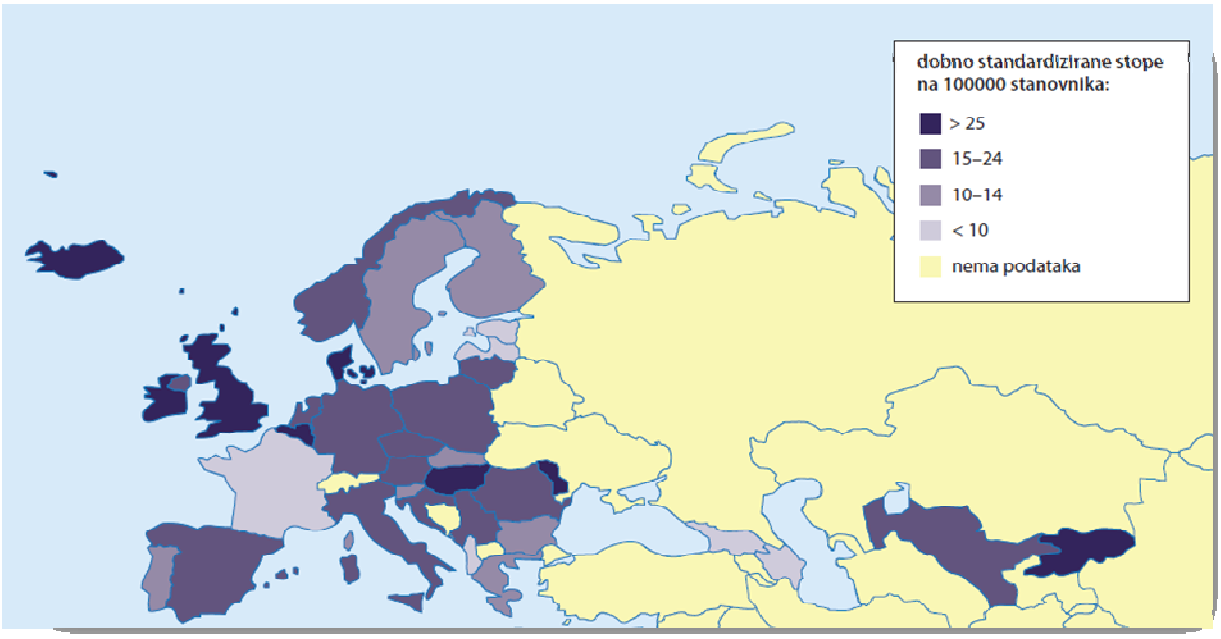
Nekoliko je čimbenika koji utječu na točnost procjene značaja KOPB-a. Kronična opstrukcijska plućna bolest se obično ne prepoznaje do pojave prvih značajnijih simptoma, dakle kada je već umjereno uznapredovala. Nadalje, pokazatelji značaja KOPB-a uvelike ovise o dijagnostičkim kriterijima, metodama i analitičkim pristupima primijenjenim u relevantnim epidemiološkim istraživanjima. Neujednačenost korištenih graničnih vrijednosti za definiciju opstrukcije dišnih putova može rezultirati razlikama u procjeni prevalencije bolesti i do 200%, ograničavajući mogućnost usporedbe dobivenih rezultata (28).

Starije su procjene svjetske prevalencije KOPB-a u odrasloj populaciji starijoj od 40 godina vrednovale učestalost KOPB-a na svjetskoj razini na 9,2% (29). Suvremena epidemiološka istraživanja, koja koriste standardiziranu metodologiju i fiksni spirometrijski kriterij za dijagnozu KOPB-a, ukazala su na neprikladnost metodoloških pristupa u epidemiološkim istraživanjima starijeg datuma (26,30). Prevalencija KOPB-a je veća od prethodno procijenjene, a velika varijabilnost u podacima otežava interpretaciju rezultata. Općenito se može reći da je obrazac prevalencije pokazao veću učestalost bolesti u muškaraca, starijih ljudi, onih s manje godina školovanja i većom izloženošću pušenju (31). Inicijativa pod nazivom Značaj opstrukcijske bolesti pluća (BOLD, engl. *Burden of Obstructive Lung Disease*) procijenila je ukupnu svjetsku prevalenciju KOPB-a na 10,1% (26). Temeljem podataka iz BOLD istraživanja i drugih velikih epidemioloških istraživanja najnovije procjene svjetske prevalencije KOPB-a su oko 11,7 % (1).

Podaci za Europsku uniju (EU) procjenjuju ukupnu prevalenciju KOPB-a na oko 10 % s izraženim značajnim razlikama među zemljama članicama EU-a. Razlika u procjenama prevalencije proizlazi iz veličine ispitanog populacijskog uzorka, različite dobne raspodjele ispitanika te različite izloženosti okolišnim čimbenicima (25).

Pobol KOPB-a raste sa starenjem i veći je u muškaraca. Procjene pobola ne obuhvaćaju rane stadije bolesti (blagu i umjerenu bolest) jer se one ne dijagnosticiraju i ne liječe, stoga se ne navode kao dijagnoze u medicinskoj dokumentaciji (32). Podaci dostupni za EU ukazuju da od 100000 bolesnika godišnje zaprimljenih na bolničko liječenje, njih oko 200 se zaprima zbog KOPB-a. Najviše stope bolničkog liječenja zbog KOPB-a zabilježene su u Danskoj, Mađarskoj i Rumunjskoj, dok su najniže u Švicarskoj, Francuskoj, Portugalu, Sloveniji, Hrvatskoj i Latviji (25).

Procjenjuje se da će do 2020. godine KOPB postati trećim vodećim uzrokom smrtnosti na svjetskoj razini (23). Ukupna stopa smrtnosti od KOPB-a u EU-u je 18 na 100000 stanovnika godišnje. Varijabilnost u stopama smrtnosti među zemljama članicama EU-u je prikazana na Slici 3. Zemlje s visokom prevalencijom pušenja imaju i više stope smrtnosti od KOPB-a (25). Pouzdanost dostupnih podataka za smrtnosti od KOPB-a je ograničena obzirom da se, iako je KOPB primarni uzrok smrti, smrt često krivo pripisuje nekom od prisutnih komorbiditeta, najčešće bolestima kardiovaskularnog sustava (32).



Slika 3. Stope smrtnosti za KOPB u zemljama članicama EU-a.
Preuzeto iz (25). Podaci dostupni na http://www.europeanlung.org/en/lung-disease-and-information/lung-diseases/copd. Datum pristupa 3. listopada 2016.

Obzirom na visoku prevalenciju i tijek bolesti koji nosi visoki rizik razvoja trajne nesposobnosti za rad (invaliditeta), KOPB se smatra bolešću s izrazitim ekonomskim i socijalnim značajem. U EU-u se izravni troškovi liječenja KOPB-a procjenjuju na 38,6 milijardi eura, dok se neizravni troškovi procjenjuju na 25,1 milijardi eura (1,25). Ako se u obzir uzmu i troškovi nastali gubitkom radne sposobnosti pojedinca, ukupni troškovi od KOPB-a rastu na 141,4 milijardi eura godišnje (25). Postoji izravna pozitivna povezanost ozbiljnosti bolesti i troškova liječenja. U SAD-u izravni troškovi liječenja KOPB-a iznose 32 milijarde dolara, dok su neizravni 20,4 milijardi dolara (1).

Podaci dostupni za Hrvatsku statistički se značajno ne razlikuju od podataka za druge Europske zemlje u susjedstvu. Podaci iz 2015. godine ukazuju da su kronične bolesti donjeg dišnog sustava (među koje se ubraja i KOPB) šesti vodeći uzrok smrtnosti u Hrvatskoj, sa stopom od 3,6%. Kod muškaraca je smrtnost od kroničnih bolesti donjeg dišnog sustava veća (4,3%) u usporedbi sa ženama (2,9%). Kod osoba starijih od 65 godina KOPB je vodeći uzrok pobola i bolničkog liječenja u Hrvatskoj (33,34).

1.1.5 Tijek bolesti i čimbenici rizika

Tijek KOPB-a se dugo vremena poistovjećivao s promjenom vrijednosti FEV_1 u odrasloj dobi obzirom na dugi asimptomatski (pretklinički) period KOPB-a (od 20 do 40 godina). Upravo je taj pristup omogućio prepoznavanje čimbenika koji se povezuju s promjenama vrijednosti FEV_1, modificirajući razvoj i klinički tijek bolesti (1,22).

U posljednjih desetak godina nove su spoznaje omogućile potpunije sagledavanje prirodnog tijeka bolesti. Maksimalna vrijednost FEV_1, prije početka fiziološkog opadanja plućne funkcije u odrasloj dobi jednako je važna kao i trend opadanja iste. Stoga, iako se KOPB obično klinički očituje između 40-te i 50-te godine, razvoj bolesti započinje mnogo ranije, kada se još ne mogu prepoznati njeni simptomi. Tijek KOPB-a valja promatrati već od rođenja, pa čak i začeća, a ne isključivo u okvirima promjena plućne funkcije u odrasloj dobi (35,36).

Pluća se razvijaju do 35. godine života, kada krivulja funkcije pluća pokazuje maksimalni razvoj plućne funkcije (odnosno plato), a zatim funkcija pluća fiziološki počinje opadati sa starenjem. Iako stopa opadanja funkcije pluća pokazuje velike interindividualne varijacije, ona se u zdravih muškaraca srednjih godina kreće oko 30 mL godišnje, dok je ta vrijednost u žena 25 mL godišnje. Čimbenicima rizika za razvoj KOPB-a definiraju se svi čimbenici koji utječu na smanjeni razvoj pluća, preuranjeno slabljenje funkcije pluća i/ili ubrzanje opadanja funkcije pluća (1,16,35).

Čimbenici rizika za razvoj KOPB-a su i danas aktualni, a neki od najznačajnijih su opisani u nastavku (22,32,37). Uobičajeno se dijele se na vanjske (egzogene), unutarnje (endogene) i ostale (Tablica 2). Iako je pušenje najvažniji čimbenik rizika za razvoj KOPB-a, intenzivno se istražuju i drugi čimbenici rizika obzirom da je njihovo prepoznavanje važna sastavnica planiranja prevencije i terapije KOPB-a (8,32,35).

Tablica 2.Čimbenici rizika za razvoj KOPB-a

vanjski (egzogeni)	unutrašnji (endogeni)	ostali
pušenje profesionalna izloženost onečišćenje unutarnjeg i vanjskog okoliša socioekonomski status	genski čimbenici spol i dob kronični bronhitis	preosjetljivost dišnih putova i astma perinatalni respiracijski poremećaji i respiracijske bolesti u djetinjstvu respiracijske infekcije

Dokazi dobiveni iz longitudinalnih epidemioloških istraživanja potvrđuju uzročno-posljedičnu povezanost aktivnog i (u nešto manjoj mjeri) pasivnog pušenja cigareta i KOPB-a. Pušači (i pasivni pušači) pokazuju veći broj respiracijskih simptoma (kašalj, otežano disanje, zaduha) i izraženije poremećaje plućne funkcije u usporedbi s nepušačima, što rezultira izraženijim opadanjem godišnje stope FEV_1 i većom stopom smrtnosti od KOPB-a (8,32). Pušenje se tradicionalno smatra najvažnijim rizičnim čimbenikom za razvoj KOPB-a, a prestanak pušenja najvažnija mjera u prevenciji i terapiji KOPB-a. Prevalencija KOPB-a izravno korelira s prevalencijom pušenja. Dob početka pušenja, intenzitet pušenja i pušački status smatraju se prediktorima smrtnosti od KOPB-a (8,32,35,37). U razvijenim zemljama 85-90% slučajeva KOPB-a u muškaraca uzrokovano je pušenjem. Učinak pušenja u odrasloj dobi je vrlo dobro dokumentiran: većina longitudinalnih istraživanja izvještava o padu FEV_1 u vrijednosti od 45-90 mL godišnje u populaciji pušača (35).

Izloženost organskoj i anorganskoj prašini, parama i plinovima na radnom mjestu nedovoljno je priznati čimbenik rizika za razvoj KOPB-a. Profesionalna izloženost zaslužna je za 10-20% simptoma ili poremećaja funkcije pluća koji se mogu pripisati KOPB-u. U nepušača je udio KOPB-a koji se može pripisati profesionalnoj izloženosti 31,1% (1). Rezultati nekoliko presječnih istraživanja opće populacije pokazuju da postoji učinak čimbenika koji se ugrubo svrstavaju u profesionalnu izloženost na opadanje FEV_1 i pojavnost KOPB-a. Dokazana je i značajna povezanost doza-učinak između količine (broja) štetnih čimbenika kojima su ispitanici bili izloženi i opadanja FEV_1 (32,35,38,39).

Povezanost onečišćenja okoliša s KOPB-om je vjerojatna. Stope oboljelih od KOPB-a su veće u urbanim i onečišćenim sredinama. Visoke razine urbanog onečišćenja okoliša štetna su za pojedince s već prisutnim srčanim i plućnim bolestima. Uloga onečišćenja vanjskog okoliša u nastanku KOPB-a uvelike je nepoznata, ali se smatra manjom od uloge pušenja cigareta kao čimbenika rizika (32,35).

Onečišćivači unutrašnjih prostora imaju važnu ulogu u razvoju KOPB-a, pogotovo u zemljama u razvoju. Smatraju se desetim po važnosti rizičnim čimbenikom koji se može spriječiti, a utječe na značaj KOPB-a (35). Drvo, životinjski izmet, ostaci usjeva te ugljen, koji se koriste kao goriva u otvorenim kućnim ložištima ili slabo funkcionalnim štednjacima, uzrokuju visoke razine onečišćenja unutarnjeg okoliša. Nekoliko je istraživanja povezalo učinak goriva biološkog porijekla na razvoj respiracijskih simptoma i ograničenje protoka zraka. Iako se izloženost biološkim gorivima povezuje s rizikom za razvoj KOPB-a, njihov učinak na opadanje FEV_1 je slabiji od učinka dima cigareta. Međutim, bazalne FEV_1 vrijednosti u izloženim pojedincima su niže nego u pušača, što ukazuje na činjenicu da je učinak bioloških goriva najznačajniji u djetinjstvu, primjerice kod djece koja često borave u blizini majki koje kuhaju u kućanstvima grijanim na otvorenim ložištima (32,35).

Siromaštvo se smatra čimbenikom rizika za KOPB. Dostupni su čvrsti dokazi da je u zemljama u razvoju rizik od obolijevanja od KOPB-a obrnuto proporcionalan socioekonomskom statusu. Socioekonomski status podrazumijeva lošiju prehranu, veliki broj stanovnika, veću zagađenost okoline, slabiju dostupnost zdravstvene skrbi, veću učestalost respiracijskih infekcija i veću stopu pušenja. Siromaštvo je snažan rizični čimbenik za slabo zdravlje pluća (32,35,40,41).

Danas se odbacuje procjena da je samo 15-20% pušača podložno štetnim učincima duhana i stoga razvija KOPB (27). Više je istraživanja pokazalo da taj udio doseže 25-50% (42,43). Općenito se misli da većina pušača razvija upalnu reakciju u plućima kao odgovor na dim cigareta i da ta upala utječe na funkciju pluća. Međutim, zanimljivo je zašto neki pušači razvijaju bolest za razliku od drugih pušača, iako imaju sličnu povijest pušenja. Odgovor na to pitanje daju genski čimbenici koji se povezuju s razvojem KOPB-a (35).

Najpoznatiji i najbolje istražen genski čimbenik povezan s nastankom KOPB-a je poremećaj u genu SERPINA1 koji kodira serinsku proteazu α1-antitripsin (AAT). Taj genski poremećaj dovodi do urođenog nedostatka AAT-a (osobito homozigotni oblik genotipa PiZZ, povezan s izrazito sniženom aktivnošću enzima). Kako se nedostatak AAT-a pojavljuje u samo 1-3% bolesnika s KOPB-om, neki autori smatraju da se taj genski čimbenik ne bi trebao svrstavati u rizične čimbenike za razvoj KOPB-a. Međutim, nedostatak AAT-a predstavlja model za poremećaj ravnoteže proteaza i antiproteaza, mehanizma važnog u patogenezi emfizema, koji je patološka promjena koja karakterizira KOPB. Osim pušenja, i ostali

okolišni rizični čimbenici u kombinaciji s nedostatkom AAT-a povećavaju rizik od razvoja KOPB-a (35,40,42,43).

Pozitivna obiteljska anamneza za KOPB je neovisan rizični čimbenik; obiteljska istraživanja i istraživanja na blizancima potvrdila su značaj genskog doprinosa u varijaciji plućne funkcije u pojedinih bolesnika (35).

Danas se KOPB smatra poligenskom bolešću. Još je nekoliko gena kandidata vjerojatno povezano s povećanim rizikom za razvoj KOPB-a, uključujući polimorfizme transformirajućeg faktora rasta β (TGF-β, engl. *transforming growth factor β*), faktora nekroze tumora α (TNF-α, engl. *tumor necrosis factor α*), mikrosomalne epoksid-hidrolaze 1, glutation-S-transferaze, hem-oksigenaze-1, metaloproteinaza matriksa (MMP, engl. *matrix metalloproteinases*) 1 i 12, te tkivnog inhibitora metaloproteinaze matriksa (TIMP, engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase*) 2. Nadalje, polimorfizam gena za superoksid-dizmutazu ima zaštitnu ulogu u razvoju KOPB-a kod pušača. Unatoč spomenutim činjenicama, dosadašnja istraživanja povezanosti genskih čimbenika i KOPB-a nisu dala dosljedne (reproducibilne) rezultate, te se isti trebaju tumačiti s dozom opreza (44-46).

Uloga spola kao čimbenika rizika za razvoj KOPB-a nije sasvim jasna. Poznato je da muškarci puše više, udišu dim češće i počinju pušiti u ranijoj dobi u usporedbi sa ženama. S druge strane, istraživanja su pokazala da su žene podložnije štetnim učincima pušenja od muškaraca (35,37). Iako se tradicionalno smatra da je učestalost KOPB-a veća kod muškaraca, noviji podaci ukazuju da je prevalencija bolesti gotovo jednaka u oba spola (40).

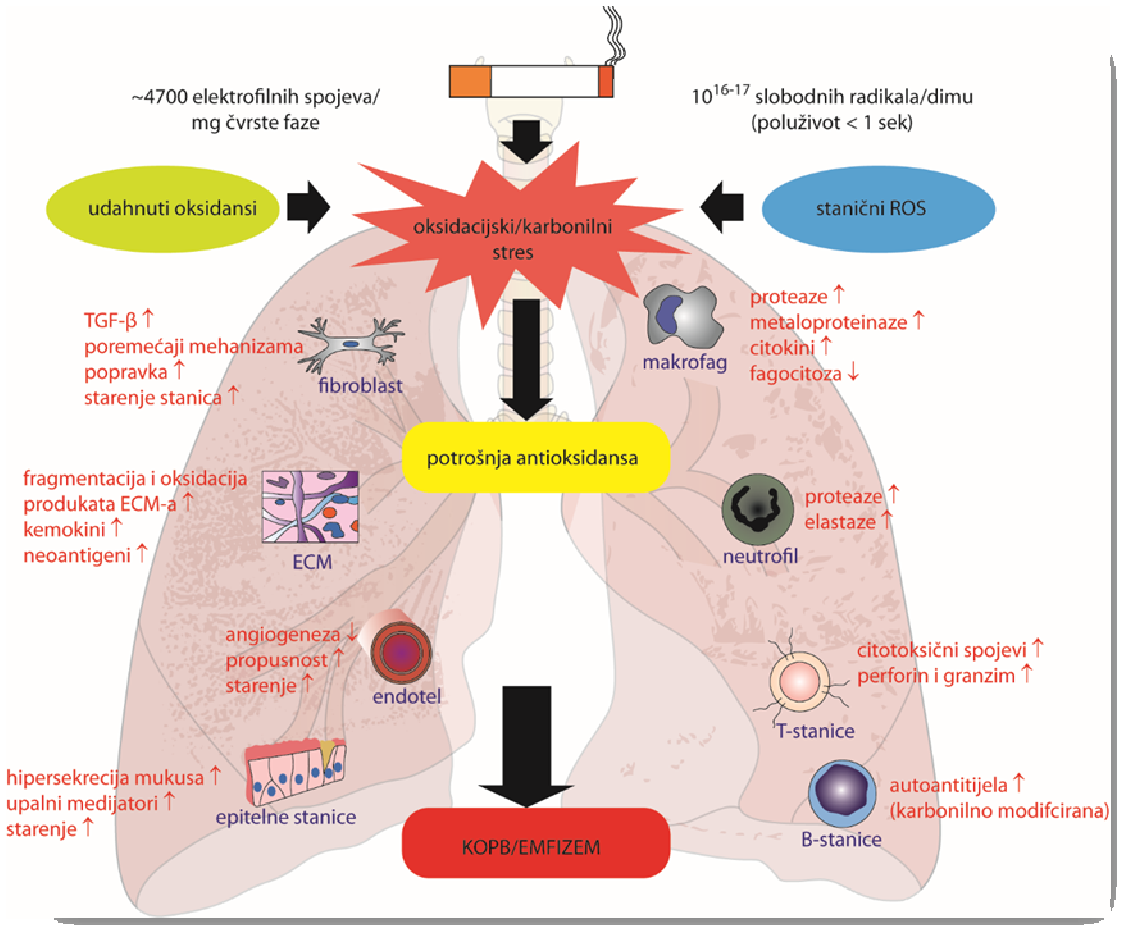
Prevalencija, morbiditet i mortalitet od KOPB-a rastu sa starenjem. Jedan od razloga povećane prevalencije KOPB-a je i starenje svjetske populacije. Dakle, demografske promjene na svjetskoj razini odražavaju se duljim životnim vijekom i većoj podložnosti kroničnim oboljenjima, kao što je i KOPB (40).

Velike longitudinalne populacijske studije su pokazale da postoji povezanost između kroničnog bronhitisa (kronične hipersekrecije mukusa) i opadanja FEV_1, morbiditeta od KOPB-a i mortaliteta od KOPB-a, koji je uglavnom posljedica povezanosti kronične hipersekrecije mukusa i smrti od ozbiljnih infekcija. Kronični bronhitis doprinosi padu FEV_1 u iznosu od 10-25 mL godišnje (35).

1.1.6 Patogeneza, patofiziologija i patologija KOPB-a

Kronična opstrukcijska plućna bolest nastaje kao posljedica dugotrajne izloženosti pojedinca štetnim plinovima i česticama, poglavito dimu cigareta. Upalna reakcija u dišnim putovima i plućnom parenhimu javlja se u svim pušačima i predstavlja fiziološku zaštitu pluća na ozljedu (noksu) nastalu djelovanjem dima cigareta. Međutim, samo ograničeni broj (podložnih) pušača razvija poremećaj regulacije upalne reakcije, koji za posljedicu ima promijenjenu i neprimjerenu upalnu reakciju koja je prisutna i nakon prestanka pušenja. Neprimjerena kronična upala uzrokuje ubrzano opadanje plućne funkcije koje obilježava KOPB (47,48).

Upalna reakcija kod pušača i bolesnika s KOPB-om obilježena je aktivacijom urođenog i stečenog imunosnog odgovora i infiltracijom upalnih stanica u dišne putove i plućni parenhim (48,49). Urođeni imunosni sustav dišnih putova i pluća obuhvaća epitelnu barijeru, mukocilijarni sustav, humoralne čimbenike (antimikrobne peptide, sustav komplementa, surfaktante) i stanice koje sudjeluju u urođenom odgovoru (prvenstveno makrofage). Štetnim djelovanjem dima cigareta na epitelnu barijeru dišnog sustava dolazi do oslobađanja unutarstaničnih molekulskih struktura nastalih oštećenjem (DAMPs, engl. *damage-associated molecular patterns*). Oni su prepoznati od strane receptora za prepoznavanje molekulskih struktura (PRRs, engl. *pattern recognition receptors*) koji su eksprimirani na alveolarnim makrofagima, dendritičnim i epitelnim stanicama dišnog sustava, čime dolazi do aktivacije upalnog odgovora (50). Kritična točka koja povezuje urođeni i stečeni imunosni odgovor, pokrećući aktivaciju komponenata stečenog imunosnog odgovora, je prezentacija antigena. Ona se odigrava u limfatičnom tkivu bronha (BALT, engl. *bronchial associated lymphatic tissue*) i regionalnim limfnim čvorovima pluća. Udahnuti antigeni odlažu se na respiracijski epitel i transportiraju specijaliziranim epitelnim stanicama ili kroz oštećeni epitel do mreže dendritičnih stanica, koje se nalaze na bazalnim membranama respiracijskog epitela. Stanice koje prezentiraju antigen cirkuliraju kroz limfne čvorove i BALT te predočuju antigene B i T limfocitima, aktivirajući ih (49).



Slika 4. Patogeneza kronične opstrukcijske plućne bolesti.
Preuzeto i prilagođeno iz (51). ROS – reaktivni kisikovi spojevi; TGF-β – transformirajući čimbenik rasta beta; ECM – izvanstanični matriks; (↑) – povišeno; (↓) – sniženo.

U upalnom odgovoru sudjeluju aktivirane epitelne stanice i rezidentni makrofagi, koji u područje upale privlače i aktiviraju polimorfonuklearne stanice, dodatne makrofage, te B i T limfocite (Slika 4). U područje upale izlučuje se niz citokina i medijatora upale koji su odgovorni za početak i kontrolu odgovora organizma na udahnute štetne čimbenike (42,49).

U dišnim putovima, plućnom parenhimu, bronhoalveolarnoj tekućini (BAL, engl. *bronchoalveolar lavage*) i ispljuvku bolesnika s KOPB-om zabilježen je 5-10 puta veći broj makrofaga u usporedbi sa zdravim pušačima. Makrofagi imaju središnju ulogu u patogenezi KOPB-a, a njihov broj pozitivno korelira s težinom bolesti. Aktiviraju se pod utjecajem dima cigareta, te pojačano izlučuju upalne medijatore kao što su TNFα, interleukin (IL)-8, IL-6, IL-1β, makrofagni upalni protein 1α (MIP-1α, engl. *macrophage inflammatory protein 1α*), leukotrien B4 (LTB4, engl. *leukotriene B4*), faktor poticanja kolonija granulocita/makrofaga

(GM-CSF, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Osim toga, makrofagi stvaraju reaktivne kisikove spojeve (ROS) i izlučuju proteaze (MMP-2, MMP-9, MMP-12, katepsine i neutrofilnu elastazu preuzetu iz neutrofila), stoga predstavljaju staničnu poveznicu između pušenja, upalne reakcije i oštećenja tkiva u KOPB-u. Makrofagi bolesnika s KOPB-om izlučuju veće količine upalnih proteina i imaju veći početni elastolitički potencijal od makrofaga zdravih pušača. Ta je činjenica još izraženija nakon izlaganja dimu iz cigareta, što znači da su alveolarni makrofagi bolesnika s KOPB-om „različiti" od makrofaga zdravih pušača i nepušača. Povećani broj makrofaga u KOPB-u rezultat je povećanog privlačenja monocita iz sistemske cirkulacije, njihove povećane proliferacije i povećanog preživljenja u plućima (49,52,53).

U ispljuvku, BAL-u i dišnim putovima bolesnika s KOPB-om nalazi se povećan broj aktiviranih neutrofila. Djelovanjem kemotaktičnih čimbenika iz epitelnih stanica pluća, neutrofili iz periferije migriraju u dišne putove. Aktivirani neutrofili izlučuju serinske proteaze (uključujući neutrofilnu elastazu, katepsin G, proteinazu-3, MMP-8 i MMP-9) i stvaraju ROS, te na taj način doprinose daljnjem oštećenju parenhima pluća i pojačanoj sekreciji mukusa. Proteaze, osobito neutrofilna elastaza, potiču lučenje mukusa iz submukoznih žlijezda i vrčastih stanica epitela. Pretjerano stvaranje mukusa i poremećaj mukocilijarnog klirensa doprinose opstrukciji dišnih putova u bolesnika s KOPB-om. Osim toga, proteaze i oksidansi oslobođeni iz aktiviranih neutrofila djeluju elastolitički i oštećuju tkivo pluća. Neutrofili izlučuju citokine, osobito IL-8 i LTB4, koji u to područje privlače dodatne neutrofile (42,52,53).

U parenhimu, perifernim i centralnim dišnim putovima te u sistemskoj cirkulaciji bolesnika s KOPB-om zabilježen je povećan broj limfocita T, s predominacijom CD8+ (citotoksičnih) limfocita T nad CD4+ (pomoćničkim) limfocitima T. Povećan broj limfocita T pokazuje povezanost s intenzitetom alveolarnog razaranja i težinom opstrukcije dišnih putova, što ukazuje na njihovu ulogu u patogenezi KOPB-a. Limfociti pokreću stečeni imunosni odgovor. Th1 subpopulacija pomočničkih T limfocita izlučuje interferon γ (IFNγ, engl. *interferon γ*), aktivira alveolarne makrofage i uništava čestice u njima. Citotoksični T limfociti izlučuju perforin, granzim i TNF-α, i na taj način potiču citolizu i apoptozu epitelnih stanica alveola. Smatra se da limfociti u bolesnika s KOPB-om sudjeluju u poticanju upalnog procesa i nakon prestanka pušenja. Jedan od mehanizama kojim postižu taj učinak je stalno poticanje imunosne i upalne reakcije stvaranjem novih autoantigena tijekom destrukcije tkiva pluća (čime se potiče autoimunost). Drugi mehanizam podrazumijeva kroničnu prisutnost vanjskih

patogena (bakterija i virusa) u donjem dijelu respiracijskog sustava bolesnika s KOPB-om, što izaziva kroničnu stimulaciju imunosnog odgovora (42,49,53,54).

Epitelne stanice imaju važnu ulogu u urođenoj obrani dišnih putova. Stvaraju mukus, izlučuju defensine i kationske peptide s antimikrobnim učinkom, te imaju ulogu i u popravku tkiva. Izlučuju antioksidanse i antiproteaze (npr. sekretorni leukoproteazni inhibitor, SLPI, engl. *secretory leukocyte protease inhibitor*). Dim cigareta uzrokuje poremećaj svih navedenih zaštitnih mehanizama i čini pojedinca podložnijim infekciji. Kao odgovor na oštećenje, epitelne stanice aktiviraju različite zaštitne mehanizme. Jedan od njih je skvamozna metaplazija epitela, čija je posljedica poremećaj mukocilijarne zaštite u dišnim putovima. Osim toga, epitelne se stanice aktiviraju i postaju važan izvor upalnih medijatora i proteaza u KOPB-u. Aktivirane dimom cigareta stvaraju upalne medijatore: TNF-α, IL-1β, GM-CSF i IL-8. Dodatno izlučuju i TGF-β, čime induciraju lokalnu fibrozu. Aktivirane epitelne stanice važan su izvor ROS-a u plućima (53,55-57).

Analizom bioptičkih materijala iz pluća i bronha, te ispitivanjem induciranog ispljuvka, potvrđena je prisutnost upalne reakcije u plućima svih pušača. Međutim, bolesnike s KOPB-om karakterizira pojačana upalna reakcija na inhalirane plinove i štetne čestice, koja nadilazi normalni upalni odgovor pluća. Osim toga, KOPB može napredovati i unatoč prestanku pušenja, stoga se smatra da dodatni mehanizmi imaju ulogu u podržavanju upalnih procesa u KOPB-u. Mehanizmi komplementarni prethodno opisanom patogenetskom mehanizmu KOPB-a su višestruki, te uključuju poremećaj ravnoteže proteaza i njihovih inhibitora (antiproteaza), oksidacijski stres, apoptozu i promjene koje se povezuju s ubrzanim starenjem stanica (48,58).

Poremećaj ravnoteže proteaza i antiproteaza nastaje kao posljedica povećanih koncentracija proteaza i/ili povećane potrošnje njihovih inhibitora (antiproteaza). Smatra se glavnim mehanizmom nastanka emfizematoznih promjena u KOPB-u. S patogenetskog aspekta, poremećaj ravnoteže proteolitičkih enzima i njihovih inhibitora uzrokovan je ROS-om. Dim cigareta može inaktivirati antiproteaze i izravno aktivirati alveolarne makrofage i neutrofile u upalnom području. Makrofagi i neutrofili izlučuju niz proteaza: neutrofilnu elastazu, proteinazu-3, MMP-ove i katepsine. One se dalje mogu međusobno kaskadno aktivirati, odnosno kaskadno međusobno inaktivirati vlastite inhibitore. Proteaze imaju sposobnost razgradnje komponenata izvanstaničnog matriksa (elastina i kolagena) u parenhimu pluća.

Najbolje istražena proteaza je neutrofilna elastaza, serinska proteaza porijeklom iz neutrofila čije djelovanje u parenhimu pluća inhibira AAT. Bolesnici s nasljednim nedostatkom AAT-a imaju povećanu proteolitičku aktivnost neutrofilne elastaze i razvijaju emfizem pluća u ranoj životnoj dobi. Osim toga, neutrofilna elastaza značajno stimulira lučenje mukusa i izlučivanje IL-8 iz epitelnih stanica dišnih putova. Metaloproteinaze matriksa imaju također ulogu u patogenezi emfizema i KOPB-a. U BAL-u i parenhimu pluća bolesnika s emfizemom i KOPB-om nađene su povećane koncentracije MMP-1, MMP-9 i MMP-12 koje koreliraju s funkcijom pluća mjerenom FEV_1 (49,53). Proteaze oslobođene iz aktiviranih polimorfonukleara mogu inducirati apoptozu epitelnih i endotelnih stanica pluća (59).

U fiziološkim uvjetima je učinak proteaza neutraliziran djelovanjem antiproteaza, prvenstveno AAT-a, SLPI-a i TIMP-a. Međutim, inhalacijom štetnih čestica i plinova dolazi do inaktivacije endogenih antiproteaza, u prvom redu AAT-a. Pomak ravnoteže u smjeru proteaza u KOPB-u uzrokuje razgradnju izvanstaničnog matriksa, pri čemu dolazi do stvaranja fragmenata elastina i kolagena koji imaju kemotaktična svojstva za monocite i neutrofile (53,60).

Oksidansi i antioksidansi, u stanici i izvan nje, nalaze se u stanju krhke ravnoteže koja je neophodna kako bi se mogle odvijati normalne funkcije u stanicama pluća. Pomak te ravnoteže u smjeru oksidansa naziva se oksidacijskim stresom (48,53).

Brojni dokazi ukazuju na prisutnost oksidacijskog stresa u plućima bolesnika s KOPB-om, u usporedbi sa zdravim ispitanicima ili pušačima bez KOPB-a. Dokazano je da se oksidacijski stres pojačava u egzacerbacijama KOPB-a. Oksidacijski stres je usko povezan s mehanizmima poremećaja ravnoteže proteaza i antiproteaza jer uzrokuje inaktivaciju antiproteaza, a potiče upalne stanice na lučenje proteaza, te time doprinosi patogenezi emfizema. Oksidansi izravno poremećuju sintezu elastina i kolagena, kao i mehanizme popravka oštećenog tkiva. Oksidacijski stres povezan je i s mehanizmima apoptoze u stanici i procesima starenja stanice (52,61).

Izvori oksidansa u bolesnika s KOPB-om su egzogeni (udisanje dima cigareta i/ili okolišni zagađivači) i endogeni (aktivirani fagociti). Kronično pušenje izlaže plućno tkivo dimu cigareta. Dim cigareta je kompleksna smjesa više od 4700 kemijskih spojeva, uključujući nikotin, teške metale, karcinogene i oko 10^{17} oksidansa/slobodnih radikala u plinovitoj i čvrstoj fazi. Dodatni izvor oksidansa su i ROS i reaktivni dušikovi spojevi (RNS) oslobođeni

iz aktiviranih upalnih stanica (neutrofila, makrofaga i epitelnih stanica) (Slika 4). Povećani broj neutrofila i makrofaga u plućima bolesnika s KOPB-om oslobađa veće količine oksidansa u usporedbi s nepušačima. Superoksidni anion, nastao djelovanjem nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) - oksidaze, i vodikov peroksid, nastao pregradnjom superoksidnog aniona, u prisutnosti slobodnog željeza mogu međusobno reagirati, čime nastaje izrazito reaktivni hidroksilni radikal. Superoksidni anion može reagirati s dušikovim oksidom (NO) stvarajući peroksinitrit, koji može također stvarati hidroksilni radikal. Kumulativni učinak egzogenog i endogenog oksidacijskog stresa očituje se u izravnom oštećenju ciljnih stanica, osobito proteina, deoksiribonukleinske kiseline (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) i lipida, ali i poticanju stvaranja daljnjih medijatora oksidacije (57,62).

Oksidacijski stres ima temeljnu ulogu u amplifikaciji upalne reakcije u KOPB-u. Reaktivni kisikovi spojevi su povezani s aktivacijom transkripcijskih faktora (jezgrenog faktora kappa B, NF-κB, engl. *nuclear factor kappa B*, i aktivacijskog proteina 1, AP-1, engl. *activator protein 1*) koji pojačavaju sintezu upalnih medijatora i u područje upale privlače upalne stanice (52,53,58,62). Okolišni oksidansi i oni porijeklom iz aktiviranih upalnih stanica mogu dovesti do aktivacije unutarstaničnih signalnih putova, rezultirajući povećanom transkripcijom niza upalnih i antioksidacijskih gena uključenih u apoptozu, proliferaciju i diferencijaciju stanice (57). Ako se ROS stvaraju u blizini staničnih membrana mogu inducirati peroksidaciju polinezasićenih masnih kiselina iz lipida staničnih membrana i nakupljanje njihovih produkata kao što su malondialdehid (MDA, engl. *malondialdehyde*), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE, engl. *4-hydroxy-2-nonenal*), 2-propenal (akrolein) i F2-izosprostani. Peroksidacija lipida narušava integritet stanične membrane i povećava njenu propusnost, a inaktivira integralne membranske receptore i enzime. Aldehidi stvoreni endogeno su toksični za stanice i uključeni u prijenos signala u upalnom odgovoru pluća. U BAL-u kao i kondenzatu izdaha bolesnika s KOPB-om su nađene povišene koncentracije produkata lipidne peroksidacije u odnosu na nepušače (48,63).

Reaktivne kisikove spojeve inaktiviraju antioksidacijski mehanizmi prisutni u plućima. Oni obuhvaćaju enzimske i ne-enzimske antioksidanse, a predstavljaju prvu obranu od ROS/RNS-a. Enzimski antioksidansi uključuju porodicu superoksid-dizmutaza, katalazu, glutation-peroksidazu (GPx, engl. *glutathione peroxidase*), glutation-S-transferazu i tioredoksin. Ne-enzimski antioksidansi su niskomolekulski spojevi poput glutationa (GSH, engl. *glutathione*), albumina, askorbata, urata, α-tokoferola, bilirubina, ceruloplazmina,

transferina i laktoferina. U fiziološkim uvjetima ti antioksidansi neutraliziraju stvorene oksidanse. Međutim, čini se da su u KOPB-u antioksidacijski mehanizmi poremećeni što pogoršava prisutni oksidacijski stres (53,64).

Alveole su u stalnom doticaju s atmosferskim zrakom i stoga stalno izložene nepovoljnim vanjskim utjecajima. Odgovor alveola na okolišna oštećenja jest programirana stanična smrt, koja je u fiziološkim uvjetima u ravnoteži s procesima obnove stanica i stvaranjem novih alveola. Alveolarna apoptoza dokazana je u plućima bolesnika s KOPB-om, a poremećaj mehanizama apoptoze i/ili popravka strukturnih stanica pluća, pod utjecajem dima iz cigareta, predložen kao jedan od elementarnih mehanizama u patogenezi KOPB-a (65). Ispitivanja na humanim uzorcima i životinjama dokazala su ulogu apoptoze u patogenezi KOPB-a i emfizema (66).

Mehanizmi apoptoze isprepleću se s oksidacijskim stresom i poremećenom ravnotežom proteaza i antiproteaza te uzrokuju razaranje plućnog parenhima i produbljivanje upalne reakcije (58,61). Apoptoza zahvaća strukturne stanice u parenhimu pluća (epitelne i endotelne stanice alveola). Smatra se da su poremećaji u signalnim putovima vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) i njegovog receptora (VEGFR-2, engl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*) uključeni u apoptozu alveolarnih epitelnih stanica, što je i dokazano u eksperimentalnim modelima emfizema. Vaskularni endotelni faktor rasta ima snažna angiogena svojstva, a u plućima ima ulogu očuvanja integriteta epitela, stoga ga nalazimo u visokim koncentracijama (59). Osim toga, VEGF inhibira apoptozu *in vitro* inaktivacijom kaspaza i aktivacijom antiapoptoznih molekula. Uzorci BAL-a i pluća bolesnika s KOPB-om imaju smanjenu ekspresiju VEGF i VEGFR-2, a ona je povezana s pojačanom apoptozom alveolarnih stanica i razvojem emfizema. Nadalje, oksidacijski stres uzrokovan dimom cigareta može inducirati apoptozu. Ligand koji inducira apoptozu povezan s faktorom nekroze tumora (TRAIL, engl. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) se oslobađa iz aktiviranih upalnih stanica, pod utjecajem oksidacijskog stresa i upale prisutne u emfizemu pluća. Obzirom na njegovu ulogu u poticanju apoptozne signalizacije, smatra se da bi mogao imati ulogu u apoptozi alveolarnih stanica. Pokazano je da su njegovi receptori pojačano eksprimirani na epitelnim stanicama alveola u emfizemu (59,61,66,67).

Autoimunost podrazumijeva neprimjeren odgovor imunosnog sustava na vlastite antigene. Oksidansi i proteaze prisutne u plućima bolesnika s KOPB-om mogu modificirati antigene

domaćina i iz njih stvoriti nepoznate molekule koje će potaknuti autoimunosni odgovor. Neuspješnim uklanjanjem apoptoznih stanica koje dovodi do sekundarne nekroze i/ili primarnom nekrozom izlažu se molekule koje su obično prisutne isključivo u citoplazmi ili jezgri, što može potaknuti autoimunosnu reakciju. Glavne stanice koje sudjeluju u autoimunosnoj reakciji su NK-stanice (NK, engl. *natural killer*); one prepoznaju autoantigene i induciraju apoptozu ciljne stanice. Postoje dokazi da autoimunosna reakcija doprinosi aktivaciji apoptoze u emfizemu (59).

Starenje stanica je degeneracijski proces uzrokovan nakupljanjem oštećenih molekula u stanicama, a dovodi do disfunkcije stanica, tkiva i stanične smrti. Posljedica je međudjelovanja gena, okoline i unutrašnjih poremećaja u organizmu (primjerice poremećaj mehanizama popravka od oštećenja u stanicama). Dokazano je da pušenje potiče preuranjeno starenje svih stanica u organizmu, pa tako i starenje strukturnih stanica pluća. Naime, povećane koncentracije slobodnih radikala aktiviraju transkripcijske faktore osjetljive na oksidoredukcijsku ravnotežu, a ovi aktiviraju višestruke gene koji kodiraju upalne molekule. Osim toga, unutarstanični oksidoredukcijski status aktivira i tzv. stresne kinaze, koje igraju važnu ulogu u procesu starenja.

Kronična opstrukcijska plućna bolest je povezana sa strukturnim i funkcionalnim promjenama u plućima koje se povezuju sa starenjem pluća. Pokazatelji procesa starenja stanice u organizmu, kao što su skraćivanje telomera, nakupljanje oštećenja u molekuli DNA zbog poremećaja mehanizama njenog popravka, epigenske promjene, gubitak homeostaze proteina i mitohondrijska disfunkcija, pronađeni su u epitelnim i endotelnim stanicama pluća bolesnika s emfizemom i u leukocitima bolesnika s KOPB-om. Većina bolesti koje se povezuju sa starenjem, pa tako i KOPB, podrazumijevaju kroničnu upalu s povećanim brojem cirkulirajućih upalnih stanica i upalnih citokina. Stoga se ta patogenetska hipoteza intenzivno istražuje. Emfizem i starenje pluća dijele zajedničke mehanizme nastanka (apoptoza, oksidacijski stres i upala) (47,61,65).

Patološka obilježja KOPB-a su: (a) kronična upala centralnih dišnih putova koja se klinički opisuje kao kronični bronhitis, (b) destrukcija plućnog parenhima koja se klinički očituje kao emfizem i (c) kronična upala i opstrukcija malih dišnih putova koja je karakteristična za bronhiolitis. Sinergistički učinak tih promjena očituje se kao opstrukcija dišnih putova (42,48).

Kronični bronhitis se definira prisutnošću kroničnog kašlja i kroničnog iskašljavanja u trajanju od najmanje 3 mjeseca godišnje u dvije uzastopne godine (1). Kašalj i iskašljavanje koji obilježavaju kronični bronhitis u KOPB-u su rezultat aktivacije urođenog imunosnog odgovora na štetno djelovanje dima iz cigareta. Upalni proces u kroničnom bronhitisu zahvaća epitelne stanice i mukozne žlijezde centralnih dišnih putova. Dolazi do hiperplazije vrčastih stanica, zadebljanja subepitelne bazalne membrane i hiperplazije subepitelnih mucinskih žlijezda. Posljedice su pretjerano stvaranje sekreta (mukusa), poremećaj u mukocilijarnom klirensu i poremećaj integriteta epitelne barijere. Zbog pojačanog odlaganja vezivnog tkiva (pod utjecajem TGF-β) dolazi do zadebljanja bronhijalnog zida. Kronična pojačana sekrecija mukusa značajno korelira s opadanjem plućne funkcije i s povećanim rizikom od hospitalizacije zbog KOPB-a (48,49,60).

Emfizem se patološki definira kao ireverzibilno razaranje alveola s povećanjem zračnih prostora distalno od krajnjih bronhiola i gubitkom elastičnosti parenhima pluća, čime se umanjuje maksimalni volumen izdaha, što dovodi do hiperinflacije i u konačnici doprinosi ograničenju protoka zraka i poremećaju u izmjeni plinova u alveolama (48,49,55). Ključni patogenetski mehanizam u emfizemu je poremećaj ravnoteže proteaza i antiproteaza koji uzrokuje proteolizu komponenti izvanstaničnog matriksa. Taj se koncept razvio iz spoznaja o ranom razvoju emfizema kod bolesnika s genskim nedostatkom AAT-a. Hipoteza o ulozi poremećaja ravnoteže proteaza i antiproteaza temelji se na destrukciji elastina i na inaktivaciji antiproteaza (48). Međutim, razaranje stanica u emfizemu podrazumijeva i dva dodatna mehanizma: oksidacijski stres i apoptozu alveolarnih stanica. Upalne stanice (neutrofili, makrofagi i citotoksični limociti T) aktivno sudjeluju u patogenezi alveolarnog razaranja (67).

Mali dišni putovi su anatomska područja gdje se lokalizira najizraženija opstrukcija u KOPB-u. Upala malih dišnih putova (bronhiolitis) se očituje nakupljanjem upalnog infiltrata u lumenu što dovodi do suženja i/ili potpunog začepljenja malih dišnih putova, bronha i bronhiola manjih od 2 mm u promjeru, te značajno doprinosi ograničenju protoka zraka. Odlaganje vezivnog tkiva u stijenke dišnih putova i hipertrofija glatkih mišića doprinose fiksnom ograničenju protoka zraka ograničenjem širenja dišnog puta. Bolesnici s KOPB-om pokazuju povećano zadebljanje malih dišnih putova i povećano nakupljanje upalnog infiltrata, a ti pokazatelji dobro koreliraju s progresijom bolesti (68). Dodatno, upalni proces uništava veze između alveola i vanjskog zida malih dišnih putova, što doprinosi ograničenju protoka zraka (49,54).

1.1.7 Liječenje KOPB-a

Kronična opstrukcijska plućna bolest se može spriječiti i uspješno liječiti, ali se ne može izliječiti. Posljednjih se godina nastoje identificirati skupine bolesnika s istom kliničkom prezentacijom bolesti (fenotipom) kako bi se za njih mogli osmisliti novi terapijski pristupi prilagođeni pojedinačnom bolesniku.

Međutim, iako se razvojem novih terapija nastoji pristupiti kompleksnosti i heterogenosti bolesti, većina sadašnjih terapijskih mogućnosti se još uvijek temelji na ograničenom broju lijekova (69). Temeljne smjernice za liječenje KOPB-a objavljene su u Svjetskoj strategiji za dijagnozu, liječenje i prevenciju kronične opstrukcijske plućne bolesti (1). Međutim, valja istaknuti da je kumulativna korist liječenja KOPB-a ograničena. Naime, iako su kratkotrajni učinci na simptome i učestalost egzacerbacija očiti, dugotrajno nema značajnog učinka na opadanje funkcije pluća i smrtnost bolesnika s KOPB-om (69).

Liječenje KOPB-a ovisi o težini bolesti. Tradicionalno se dijeli na farmakološko liječenje i ne-farmakološke mjere (1,70). Smjernice GOLD skupine ističu prestanak pušenja kao prvu i najvažniju ne-farmakološku mjeru u liječenju KOPB-a. Unatoč tome što ne dovodi do potpunog izlječenja, prestanak pušenja ima značajan utjecaj na prirodni tijek bolesti i može značajno umanjiti opadanje funkcije pluća. Osim toga, preporuča se i smanjenje izloženosti ostalim čimbenicima rizika (1).

Ciljevi optimalnog farmakološkog liječenja KOPB-a su smanjiti intenzitet i učestalost simptoma, smanjiti učestalost i težinu egzacerbacija, poboljšati zdravstveno stanje i fizičku aktivnost bolesnika. Odabir primjerenog farmakološkog pristupa specifičan je za bolesnika i ovisi o težini bolesti, riziku od egzacerbacija i odgovoru na primijenjenu terapiju (1,5). Farmakološka terapija uključuje bronhodilatatore (inhalacijske $beta_2$-agoniste i antikolinergike kratkog i dugog djelovanja i/ili njihovu kombinaciju). Bronhodilatatori rezultiraju smanjenjem dinamične hiperinflacije i boljim pražnjenjem pluća što se očituje u povećanju vrijednosti FEV_1 (1,5,71). Primjena bronhodilatatora kratkog djelovanja preporučena je terapija u GOLD A stadiju bolesti, ali i za olakšavanje simptoma u svih GOLD skupina. Za GOLD B stadij, u kojem bolesnici pokazuju izraženije simptome, preporučeni su bronhodilatatori dugog djelovanja. U skupinama bolesnika s većim rizikom od egzacerbacija (GOLD C i D) terapija prvog izbora je kombinacija inhalacijskih kortikosteroida i bronhodilatatora dugog ili kratkog djelovanja, jer se pokazalo da su obje kombinacije jednako učinkovite u smanjenju učestalosti egzacerbacija i poboljšavaju općeg stanja bolesnika.

Inhalacijski kortikosteroidi u kombinaciji s inhalacijskim beta$_2$-agonistima dugog djelovanja pokazuju veću učinkovitost od zasebne primjene tih lijekova kod težih oblika bolesti (1,69,70). Antagonisti fosfodiesteraze 4 (PDE4) djeluju protuupalno, kao i sistemski kortikosteroidi, koji se zbog značajnih neželjenih učinaka ne mogu primjenjivati dugoročno. Antagonisti PDE4 su se pokazali izuzetno učinkoviti u prevenciji egzacerbacija u skupina bolesnika s GOLD C i D stadijem bolesti s fenotipom kroničnog bronhitisa. Dakle, općenito se može reći da skupine bolesnika s izraženijim simptomima zahtijevaju više bronhodilatatora, dok grupe s višim rizikom (C i D) zahtijevaju protuupalnu terapiju (69,70). Antibiotici se koriste u liječenju akutnih egzacerbacija. Kod bolesnika koji pokazuju hipoksemiju i kongestivnu bolest srca, koristi se i terapija kisikom jer umanjuje stopu smrtnosti i poboljšava kvalitetu života (1).

Obzirom da je KOPB progresivna bolest, ne-farmakološki pristup liječenju usmjeren je na ublažavanje dnevnih simptoma i poboljšanje kvalitete života. Ne-farmakološke mjere, osim prestanka pušenja i smanjenja izloženosti ostalim čimbenicima rizika, uključuju cijepljenje, rehabilitaciju pluća, fizičku aktivnost i terapiju kisikom (1,70).

1.2 Sistemski učinci kronične opstrukcijske plućne bolesti

Iako se specifični strukturni poremećaji, koji rezultiraju kroničnom opstrukcijom dišnih putova karakterističnom za KOPB, prvenstveno odnose na plućni parenhim i dišne putove, KOPB je poremećaj koji ima značajne sistemske učinke (72,73).

Dim cigareta, kao najvažniji rizični čimbenik za razvoj KOPB-a, uzrokuje neprimjeren upalni odgovor u plućima i uvjetuje razvoj plućne komponente bolesti. Međutim, dim cigareta ima i dalekosežnije, sistemske učinke, koji se primarno očituju kao sistemska upala i sistemski oksidacijski stres (74,75). Pušenje se smatra svojevrsnom poveznicom između plućne i sistemske upalne reakcije u KOPB-u, a sistemski učinci pušenja značajno doprinose razvoju sistemskih poremećaja karakterističnih za KOPB, te drugih kroničnih poremećaja (koji se u KOPB-u očituju kao komorbiditeti) (76). Zajednički patobiokemijski mehanizam razvoja kroničnih bolesti i KOPB-a je sistemski upalni odgovor (72,73).

Dokazi o prisutnosti neprimjerenog sistemskog upalnog odgovora u bolesnika s KOPB-om su mnogobrojni, a odnose se na prisutnost povišenih koncentracija upalnih medijatora, proteina akutne faze, biljega oksidacijskog stresa i imunosnog odgovora u uzorcima bolesnika s KOPB-om, u usporedbi s pušačima koji nisu razvili bolest.

U perifernoj cirkulaciji bolesnika sa stabilnim KOPB-om dokazane su povišene koncentracije proteina akutne faze C-reaktivnog proteina (CRP) i fibrinogena, zatim leukocita i upalnih citokina TNF-α, IL-6 i IL-8. Ta činjenica ukazuje na postojanje perzistirajuće sistemske upale niskog intenziteta u KOPB-u. Osim toga, povišene koncentracije upalnih pokazatelja obrnuto su proporcionalne vrijednostima spirometrijskih parametara, neovisno o dobi, spolu, BMI-u i intenzitetu pušenja. Sistemska upala niskog stupnja dokazana je i u nepušača s prisutnim ograničenjem protoka zraka (77-81).

Mehanizam nastanka sistemske upale nije jasan. U razjašnjavanju porijekla sistemske upale prevladavaju dvije hipoteze. Prva podrazumijeva „prelijevanje“ upalnih medijatora iz plućnog odjeljka u sistemsku cirkulaciju čime dolazi od generalizacije upale. Druga podrazumijeva obratni mehanizam: sistemska upalna reakcija komponenta je KOPB-a koja uzrokuje poremećaje u plućima i razvoj KOPB-a. Porijeklo sistemske upale u KOPB-u može se tražiti u sistemskim učincima pušenja, hiperinflaciji pluća, hipoksiji tkiva, poremećenoj funkciji skeletnih mišića, stimulaciji koštane srži, imunosnim poremećajima i infekcijama.

Osim toga, smatra se da procesi ubrzanog starenja stanice doprinose razvoju sistemske upale. Moguće je da i genski i konstitucijski čimbenici čine pojedince s KOPB-om podložnima sistemskoj i plućnoj neprimjerenoj upali. Obzirom da nijedna od predloženih hipoteza nije dokazana, čini se da je porijeklo sistemske upale multifaktorijsko (72,77).

Oksidacijski stres ima središnju ulogu u patogenezi KOPB-a. U KOPB-u se molekularni mehanizmi upalnog odgovora isprepliću s onima oksidacijskog stresa (57,60). ROS/RNS se mogu izravno mjeriti u sistemskoj cirkulaciji, ali zbog njihovog kratkog poluživota i reaktivnosti, primjerenije je određivati ciljeve njihovog djelovanja. Oksidacijski stres, izravno ili posredstvom molekulskih produkata nastalih njegovim djelovanjem, oštećuje DNA, membranske lipide i stanične proteine, uzrokujući poremećaj stanične homeostaze i aktivaciju niza staničnih odgovora koji dovode do stanične smrti nekrozom ili apoptozom. Pri tome nastaju stabilniji produkti oksidacije, stoga se učinak ROS/RNS prati neizravnim mjerama njihove aktivnosti (82,83). Iako su u istraživanju sistemskog oksidacijskog statusa bolesnika s KOPB-om korištene različite metode na različitim populacijama, općenito se može reći da bolesnici s KOPB-om pokazuju prisutnost sistemskog oksidacijskog stresa odnosno povećane koncentracije oksidansa i snižene koncentracije antioksidansa u usporedbi sa zdravim ispitanicima (82,84).

Određivanjem ukupnog antioksidacijskog kapaciteta plazme bolesnika s KOPB-om neizravnim metodama redukcijskog potencijala plazme za željezo (FRAP, engl. *ferric reducing ability of plasma*) i antioksidacijskog kapaciteta izraženog u Trolox ekvivalentima (TEAC, engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*), dobiveni su neujednačeni rezultati: od sniženog antioksidacijskog kapaciteta plazme koji je pokazao korelaciju s težinom bolesti, do nepostojanja razlike između bolesnika sa stabilnom bolešću i kontrolnih ispitanika (84-87). Od antioksidacijskih enzima najviše su se istraživale superoksid-dizmutaza (SOD, engl. *superoxide dismutase*), katalaza i GPx u perifernoj krvi bolesnika s KOPB-om. Rezultati za SOD i CAT nisu jednoznačni, dok je u većini istraživanja nađena snižena aktivnost GPx kako u eritrocitima, tako i u plazmi i punoj krvi bolesnika s KOPB-om (84,88).

Peroksidacija membranskih lipida uzrokovana oksidacijskim stresom uzrokuje poremećaj u strukturi stanične membrane i povećava njenu propusnost. Krajnji produkti peroksidacije lipida su relativno stabilni spojevi (u usporedbi sa slobodnim radikalima), stoga se koriste kao pokazatelji oksidacijskog stresa/oštećenja. Najčešće se u kvantifikaciji oksidacijskog oštećenja koriste MDA, HNE, 2-propenal i F2-izoprostani. Obzirom da su stabilniji od

slobodnih radikala mogu difundirati unutar i izvan stanice, te napasti ciljne molekule daleko od mjesta njihova stvaranja. Lako reagiraju s proteinima, DNA i fosfolipidima, čime amplificiraju oštećenje nastalo oksidacijom. Tim mehanizmom doprinose patogenezi niza bolesti (82). Povišene koncentracije izoprostana, kao izravnih pokazatelja oksidacijskog stresa, nađene su u BAL-u, plazmi, mokraći i kondenzatu izdaha bolesnika s KOPB-om i pušača (82,89,90). Koncentracije produkata lipidne peroksidacije mjerene određivanjem koncentracije reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS, engl. *thiobarbituric acid reactive substances*) su povećane u pušača i bolesnika s akutnom egzacerbacijom bolesti (85). Oksidacijski stres u plazmi mjeren TBARS metodom obrnuto je proporcionalan FEV_1 u populacijskom uzorku, što ukazuje na povezanost peroksidacije lipida s ograničenjem protoka zraka u općoj populaciji. U općoj je populaciji pokazana i povezanost antioksidansa uzetih prehranom i funkcije pluća (91,92).

Karbonilacija proteina je najvažniji dokaz prisutnosti oksidacijskog oštećenja proteina kod bolesnika s KOPB-om. Proteinski karbonili nastaju izravnom oksidacijom aminokiselinskih ostataka u proteinu ili u sekundarnoj reakciji s primarnim oksidacijskim produktom ugljikohidrata i lipida. Iako promijenjene strukture i funkcije, karbonilirani proteini predstavljaju kemijski stabilne pokazatelje oksidacijskog stresa. Koncentracije ukupnih proteinskih karbonila su povišene u plazmi bolesnika s KOPB-om, a nekoliko je istraživanja pokazalo i njihovu korelaciju s težinom bolesti (84,86,93,94).

Sve navedeno ukazuje da je oksidacijsko oštećenje prisutno u bolesnika s KOPB-om, ali njegova točna uloga u patogenezi bolesti još nije poznata (91).

1.3 Biljezi oksidacijskih i upalnih promjena

1.3.1 Protein-kinaze aktivirane mitogenima

Protein-kinaze aktivirane mitogenima (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinases*) evolucijski su očuvana porodica protein-kinaza čija je ključna uloga prijenos različitih izvanstaničnih podražaja (signala) u stanicu. One prenose, amplificiraju i integriraju izvanstanični podražaj u vrlo specifičan stanični odgovor (95).

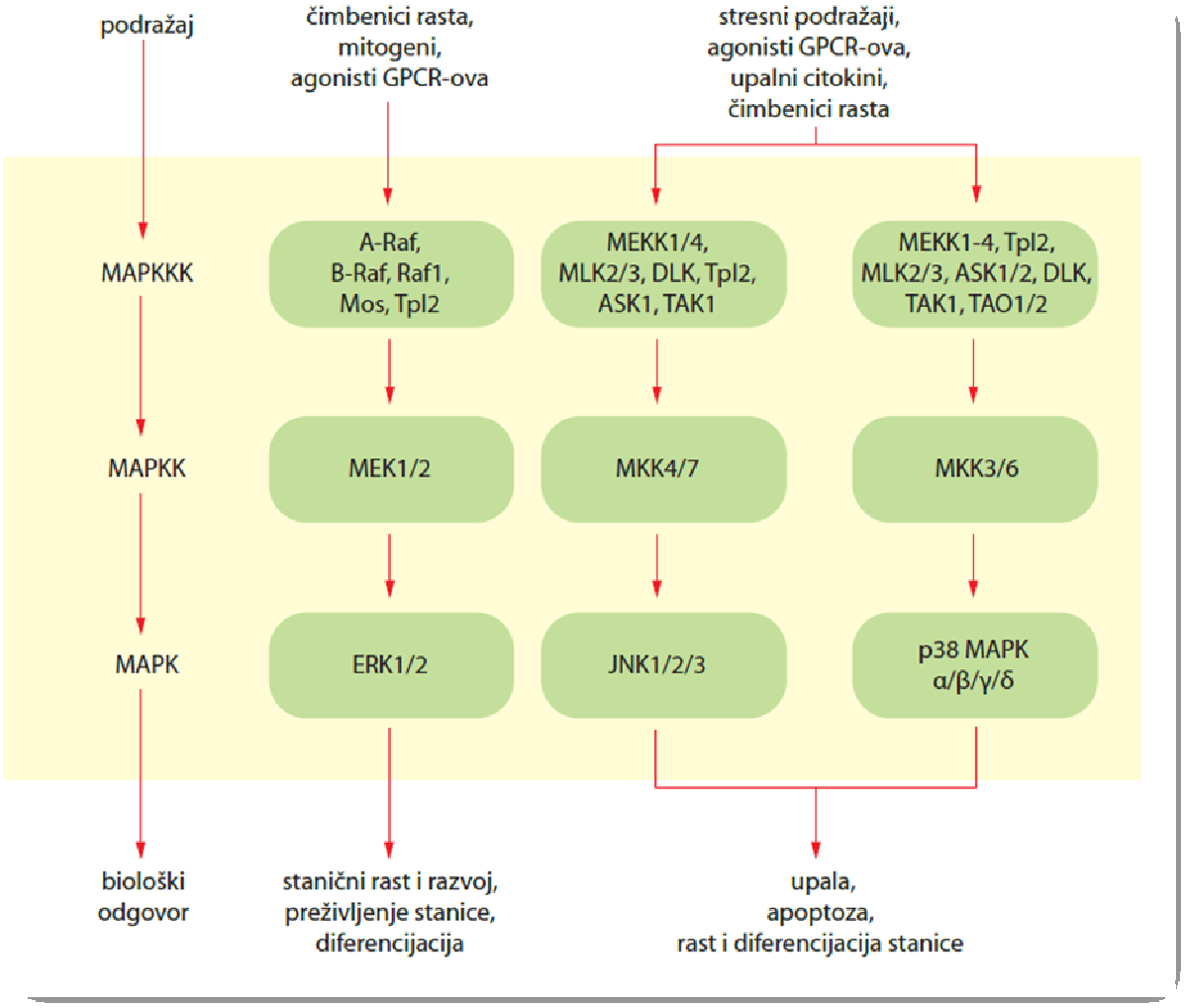
Karakteristika je MAPK signalnih kaskada središnji niz (modul) kinaza u tri razine koje se međusobno sekvencijski aktiviraju fosforilacijom (Slika 5). Prva sastavnica u modulu je MAPK kinaza kinaza (MAPKKK ili MAP3K ili MEKK ili MKKK). To je serin/treoninska kinaza, koja nakon aktivacije fosforilira sljedeću sastavnicu modula u nizu, MAPK kinazu (MAPKK ili MAP2K ili MEK ili MKK). Naposljetku, MEK fosforiliraju i aktiviraju MAP kinaze, posljednju sastavnicu MAPK kaskade koja u nastavku prijenosa signala fosforilira supstrate na serinskim i treoninskim aminokiselinskim ostacima. Organizacija MAPK u modul omogućava amplifikaciju signala, specifičnost djelovanja i regulaciju prijenosa signala unutar stanice.

Proces prijenosa signala MAPK signalnim putem pokreće se međudjelovanjem različitih izvanstaničnih signala s receptorima na površini stanice. Posredovanjem malih gvanozin-trifosfat (GTP, engl. *guanosine-5'-triphosphate*)-vezujućih proteina ili drugih adaptorskih proteina, signal se izravno ili neizravno (aktivacijom MAP4K) prenosi do MAP3K razine kaskade. Nakon toga signal putuje do MAP2K i MAPK (Slika 5).

Ciljne molekule djelovanja MAPK su transkripcijski faktori, proteini citoskeleta, kinaze i drugi enzimi, čime se regulira ekspresija gena koji sudjeluju u proliferaciji, diferencijaciji, razvoju stanice, staničnom ciklusu, upalnom i stresnom odgovoru stanice i apoptozi (96-98).

U stanicama sisavaca do sada je istraženo 5 MAPK porodica: a) kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1 i 2 (ERK1 i ERK2, engl. *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*); b) kinaze koje fosforiliraju N-kraj transkripcijskog faktora c-Jun (JNK, engl. *c-Jun N-terminal kinases*) 1-3, poznate i pod nazivom protein-kinaze aktivirane stresom 1 (SAPK1, engl. *stress-activated protein kinases 1*); c) p38 MAP kinaze (izoenzimi p38α ili SAPK2,

p38β ili p38-2, p38γ ili SAPK3 te p38δ ili SAPK4); d) ERK 3 i ERK 4, te e) ERK5, poznate kao BigMAPK (BMK) (96,97).



Slika 5. Prikaz sekvencijske aktivacije u MAPK kaskadnom modulu.
GPCR - receptori spregnuti s G proteinima. Osim Raf izoformi (Raf-1, A-Raf, B-Raf, C-Raf), MAPKKK koje mogu aktivirati ERK1/2 prijenos signala su Mos i Tpl2.

Kinaze regulirane izvanstaničnim signalima su serin/treoninske kinaze koje fosforiliraju stotine supstrata u citoplazmi i jezgri. Dvije su izoforme, ERK1 i ERK2, rasprostranjene po cijelom organizmu, te dijele 83% homologije u strukturi. Aktiviraju se fosforilacijom tirozinskih i treoninskih ostataka odvojenih glutamatom u motivu TEY aktivacijske petlje. Smatraju se najbolje opisanim MAPK. Aktiviraju ih različiti izvanstanični ligandi kao primjerice faktori rasta, hormoni, neurotransmiteri, citokini, transformirajući faktori rasta i osmotski stres. Nakon stimulacije membranskih receptora izvanstaničnim ligandom, stvara se Ras(Rap)-GTP kompleks koji se premješta na staničnu membranu i aktivira. Zatim aktivirani Ras veže amino-terminalni kraj Raf-a (MAP3K), pri čemu se ona fosforilacijom aktivira. Aktivirane Raf izoforme prenose signal do MEK1/MEK2 (MAP2K) koje u konačnici selektivno aktiviraju ERK1/2 (Slika 5). Aktivirane ERK translociraju u jezgru i reguliraju aktivnost transkripcijskih faktora ili ostaju u citoplazmi i fosforiliraju citoplazmatske proteine. Uključene su u procese stanične pokretljivosti, proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje stanice (96-101).

Tri različita gena kodira desetak JNK izoformi. Udio u homolognosti strukture kinaza iz JNK porodice je 85%. JNK1 i JNK2 su rasprostranjene po organizmu, dok je JNK3 lokalizirana pretežito u mozgu. Članovi JNK porodice imaju ulogu u odgovoru stanice na stres, u upali i apoptozi. Aktiviraju ih upalni citokini, ligandi receptora spregnutih s G proteinima (GPCR, engl. *G-protein coupled receptors*), agensi koji inhibiraju sintezu DNA i proteina, te stresovi kao toplinski šok, ionizirajuće zračenje, oksidacijski stres, kao i faktori rasta (96,98). Proteini JNK se aktiviraju dvostrukom fosforilacijom tirozina i treonina u slijedu u kojem su odvojeni prolinom u motivu TPY aktivacijske petlje. Nakon aktivacije translociraju u jezgru ili ostaju u citoplazmi. Za razliku od ERK, koje se vežu za inhibicijsku domenu transkripcijskog faktora c-Jun, JNK se vezuju za njegovu aktivacijsku domenu čime se pojačava njegova transkripcijska aktivnost. Fosforiliraju gotovo isključivo samo transkripcijske faktore, primjerice c-Jun, aktivirajući transkripcijski faktor 2 (ATF, engl. *activating transcription factor 2*), p53, Elk-1 i nuklearni faktor aktiviranih T stanica (NFAT, engl. *nuclear factor of activated T cells*) koji su odgovorni za proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanice. Stresne kinaze su uključene u sintezu citokina i upalni odgovor, apoptozu induciranu stresom, transformaciju stanice i metabolizam (99,100).

U p38 MAPK porodicu ubrajaju se homologni p38 α, β, γ i δ. Od svih p38 izoformi, p38α je najbolje opisana i prisutna je u gotovo svim stanicama. Za razliku od ERK, p38 MAPK

mogu biti lokalizirane u citoplazmi i jezgri, a nakon stimulacije mogu se premještati u oba smjera, što je u skladu s njihovom ulogom u odgovoru na stanični stres. Unutar porodice p38 MAPK homologija u strukturi je 60%, što ukazuje na veliku funkcionalnu heterogenost. Različite p38 MAP kinaze se aktiviraju djelovanjem stresa na stanicu (ultraljubičasto zračenje, osmotski stres, hipoksija, upalni citokini kao IL-1 i TNF-α, toplinski šok, lipopolisaharidi, inhibitori sinteze proteina). Zajedno s JNK porodicom MAPK čine SAP kinaze. Slično ostalim pripadnicima MAPK obitelji, i p38 se aktiviraju dvostrukom fosforilacijom treonina i tirozina, odvojenih glicinom, u TGY aktivacijskom motivu (98). Aktivirana p38 MAP kinaza prenosi signal na MAP-kinazom aktivirane protein-kinaze 2 i 3 (MAPKAP2 i MAPKAP3, engl. *MAP-kinase activated protein kinase 2 and 3*) koje nizvodno mogu fosforilirati protein toplinskog šoka 27 (Hsp27, engl. *heat shock protein 27*), MNK, MSK ili regulacijske proteine kao fosfolipazu A2 i transkripcijske faktore NF-κB, p53, ATF, Elk-1 (98,100-102).

1.3.2 Proteini toplinskog šoka

Sinteza proteina toplinskog šoka, nakon izlaganja stanice okolišnim štetnim podražajima, najzastupljeniji je i najočuvaniji odgovor na stres u živom svijetu.

Proteini toplinskog šoka su evolucijski očuvane molekule, lokalizirane u različitim staničnim odjeljcima, čija je primarna funkcija šaperonska. Šaperoni se definiraju kao nesrodni proteini koji posreduju u pravilnom smatanju drugih proteina, ne utječući na krajnje sklapanje novih proteinskih struktura. Funkcijom šaperona Hsp-ovi posreduju u sklapanju, stabilizaciji i translokaciji novosintetiziranih polipeptida i djelomično smotanih proteina kroz stanicu, olakšavaju njihovo smatanje i smještanje u različite stanične odjeljke sprječavajući njihovu agregaciju. Nadalje, štite proteine od denaturacije i oksidacijske inaktivacije ili pomažu u smatanju proteina modificiranih stresom. Obzirom da se njihova ekspresija aktivira i djelovanjem čitavog niza stresnih signala na stanicu (koji nisu isključivo toplinske prirode), u literaturi se nazivaju i stresnim proteinima, a ukupnost njihovih učinaka u stanici stresnim odgovorom. Dogovorno se dijele u šest porodica ovisno o molekulskoj masi: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 i porodica malih HSP-ova. Proteini toplinskog šoka prisutni u čovjeku i njihove primarne funkcije sažeti su u Tablici 3 (103,104).

Koncentracije Hsp-ova unutar stanice rastu i do tri puta pod utjecajem podražaja koji uzrokuju razmatanje, pogrešno smatanje ili agregaciju proteina. Sintezu Hsp-ova potiču fizikalni i kemijski čimbenici kao povišena temperatura, oksidacijski stres, ultraljubičasto

zračenje, teški metali, kemijski spojevi, virusne i bakterijske infekcije, te ishemijsko-reperfuzijska ozljeda. Povećana ekspresija Hsp-ova, posebice Hsp70 i malih Hsp-ova, potiče preživljenje stanice i umanjuje oksidacijsko oštećenje na proteinima, DNA i lipidima (105). Novija istraživanja ukazuju i na mogućnost da proces sinteze Hsp-ova započinje stimulacijom receptora na staničnoj membrani i promjenama u samoj membrani (106,107).

Transkripcija gena koji kodiraju Hsp-ove regulirana je međudjelovanjem transkripcijskog faktora toplinskog šoka (HSF, engl. *heat shock factor*) s promotorskim regijama u genima toplinskog šoka. U kralježnjaka su otkrivena 4 HSF-a, od kojih su HSF1 i HSF2 sveprisutni i evolucijski očuvani. Glavnu ulogu u odgovoru na oksidacijski i okolišni stres ima HSF1, koji je prisutan u citoplazmi stanice u neaktivnom monomernom obliku, vezan za Hsp70 i Hsp90. Nakon izlaganja stanice stresu, HSF1 se oslobađa veze s Hsp-ovima i aktivira. Aktivirani HSF1 premješta se u jezgru, organizira u homotrimerni oblik i veže DNA, čime se potiče transkripcija gena za toplinski šok. Sinteza Hsp-ova je pomno regulirana dvama mehanizmima: vezanjem Hsp70 na transaktivacijsku domenu HSF1, pri čemu se suzbija transkripcija, i međudjelovanjem vezujućeg proteina faktora toplinskog šoka (HSBP1, engl. *heat shock factor binding protein*) iz jezgre s aktivnim oblikom HSF1 i Hsp70, što rezultira inhibicijom vezanja HSF1 za DNA (103,104,107,108).

Glavnu šaperonsku ulogu u citoplazmi stanice ima Hsp70. Strukturno uključuje dvije funkcionalne jedinice: regulacijsku ATP-aznu domenu na N-kraju neophodnu za vezanje i otpuštanje drugih proteina, i domenu za vezanje supstrata na C-kraju koja veže hidrofobne regije polipeptida koji nisu smotani. U nedostatku ATP-a u stanici, Hsp70 snažno veže i stabilizira nativne nesmotane peptide (primjerice proteine citoskeleta, membranske glikoproteine, kalmodulin, zasićene dugolančane masne kiseline) i održava ih takvima do krajnjeg odredišta u stanici. Vezanjem ATP-a dolazi do otpuštanja proteina iz tog kompleksa. Ciklus vezanja i otpuštanja supstrata se ponavlja do nestanka izloženih hidrofobnih regija na polipeptidu. Šaperonska funkcija Hsp70 uključuje i transport proteina do endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija. Osim toga, Hsp70 transportira nepravilno smotane proteine koje nije moguće ponovo pravilno smotati do lizosoma ili vanjske membrane peroksisoma.

Tablica 3. Glavne porodice proteina toplinskog šoka kod čovjeka i njihove funkcije

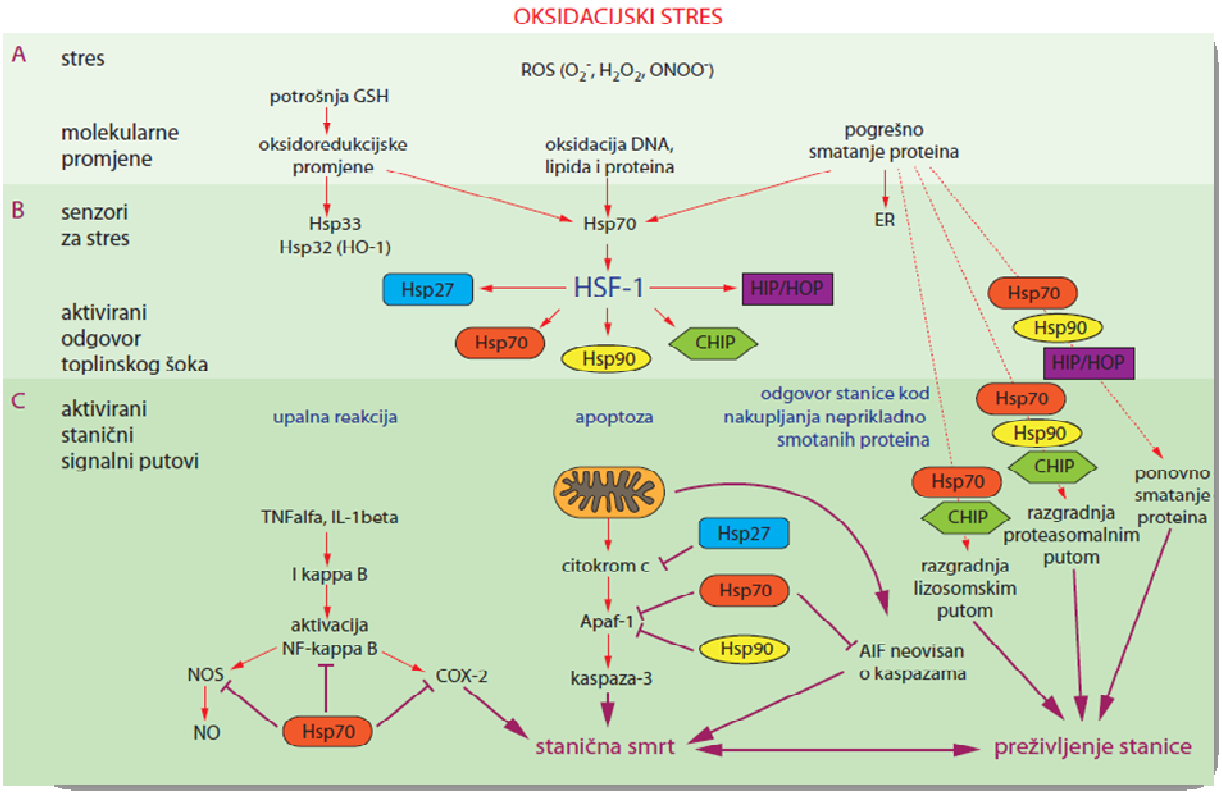
obitelj	nova nomenklatura	važniji članovi	molekularna masa (kDa)	lokalizacija unutar stanice	funkcije
sHSP	HSPE	Hsp10	10	Mth	konstitutivni heptamer; veže Hsp60 i potiče otpuštanje supstrata
	HSPB	Hsp27	27-32	Cpl, u stresu J	stvara velike agregate; sprječava agregaciju proteina; štiti od toplinskog stresa
		Hsp32		Cpl	inducira se u hipoksiji, djeluje kao oksidoredukcijski senzor u stanici
HSP40	DNAJ	Hsp40	40	Cpl, u stresu J	dimerizira s Hsp70, ima ATP-aznu aktivnost koja povećava vezanje supstrata za Hsp70
		Hsp47	47	ER	veže i prenosi kolagen iz ER-a u Golgi
HSP60	HSPD	Hsp60	60	Mth	stvara cilindrične heptamere koji se vežu s Hsp10, olakšava prijenos proteina kroz Mth membranu
	CCT	TCP1		Cpl	olakšava smatanje proteina (aktina i tubulina)
HSP70	HSPA	Hsp70	70	Cpl, u stresu J	dimerizira s Hsp40 kako bi olakšao smatanje proteina; aktivnost ovisna o ATP-u; veže proteine u stresu
HSP90	HSPC	Hsp90	90	Cpl, u stresu J	stabilizira proteine i omogućava njihov promet kroz stanicu; olakšava aktivaciju proteina (steroidnih receptora i kinaza)
HSP100	HSPH	Hsp110	110	Cpl, u stresu J	ATP-aza; odmata proteine u pripremi za ponovno smatanje, oslobađa proteine iz agregata ili kompleksa

Mth – mitohondrij. Cpl – citoplazma. J – jezgra. ER – endoplazmatski retikulum. Prilagođeno prema (106-109).

Proteini toplinskog šoka mogu potisnuti apoptozne signalne putove. Primjerice, Hsp70 inhibira apoptozu posredovanu JNK signalnim putem. Može inhibirati apoptozni proces i tako da izravno inhibira oslobađanje citokroma c i aktivnost kaspaza (103,107,110).

Uloga proteina iz obitelji malih Hsp-ova je, pored šaperonske, zaštita stanice od podražaja koji bi inače uzrokovali staničnu smrt. Prototip proteina iz obitelji malih Hsp-ova je Hsp27 koji je u stanicama konstitutivno eksprimiran u niskim koncentracijama. Njegova se sinteza brzo aktivira nakon izlaganja stanice različitim stresovima (toplinskom i oksidacijskom stresu, upalnim medijatorima). Stresni podražaj (pogotovo toplinski stres) potiče sintezu Hsp27 transkripcijskom aktivacijom gena *hsp27* posredovanom HSF1. Iako primarno tetramerne strukture, u stresu Hsp27 oligomerizira u veliki šaperon koji veže neprikladno smotane proteine i sprječava njihovu agregaciju do ponovnog smatanja od strane ATP-ovisnih šaperona, kao što su Hsp70, Hsp40, Hsp90. Fosforilacijom se umanjuje njegova sposobnost skladištenja denaturiranih supstrata, što se tumači poticanjem njihova ponovnog sklapanja. Općenito, Hsp27 ima ulogu i u staničnom rastu, diferencijaciji, održavanju oksidoredukcijske ravnoteže unutar stanice i tumorigenezi. On povećava otpornost stanice na različite stresove, uključujući toplinski, oksidacijski i citotoksični stres. U *in vitro* modelima može inhibirati apoptozu, pogotovo nakon oksidacijskog stresa. Čini se da taj antiapoptozni učinak potječe iz zaštitnog djelovanja prema antioksidacijskim enzimima koji održavaju glutation u reduciranom obliku u stanici. Osim toga može inhibirati peroksidaciju lipida i stabilizirati proteine citoskeleta. Dodatno, Hsp27 može vezati oksidirane proteine i usmjeravati ih prema razgradnji (109,111).

Iako se tradicionalno Hsp-ovi smatraju unutarstaničnim molekulama, oni posjeduju i izvanstanične funkcije te su prisutni u cirkulaciji zdravih osoba. Izvanstanični Hsp-ovi djeluju kao snažni aktivatori imunosnog sistema, potiču sintezu upalnih citokina u monocitno-makrofagnim stanicama, te aktiviraju sazrijevanje dendritičnih stanica. Oslobađaju se u izvanstanični prostor nakon nekroze stanice ili neovisno o njoj, nakon djelovanja različitih stresnih podražaja na stanicu, stoga su njihove povećane koncentracije zabilježene u različitim poremećajima. Mehanizmi fiziološkog oslobađanja Hsp-ova i njihovo značenje nisu dovoljno razjašnjeni (105,107).



Slika 6. Uloga proteina toplinskog šoka u oksidacijskom stresu.

A – molekularne promjene nakon izlaganja oksidacijskom stresu. B – elementi odgovora toplinskog šoka (stresnog odgovora). C – stanične promjene nakon izlaganja oksidacijskom stresu.
ROS – reaktivni kisikovi spojevi (superoksidni anion, vodikov peroksid, peroksinitrit); GSH – glutation; Hsp – protein toplinskog šoka; HO-1 – hem-oksigenaza 1; ER – endoplazmatski retikulum; HSF – transkripcijski faktor toplinskog šoka; TNFalfa – faktor nektroze tumora alfa; I kappa B – inhibitor kappa B; NF kappa B – nuklearni faktor kappa B; NOS – sintaza dušikovog oksida; NO – dušikov oksid; COX-2 – ciklooksigenaza 2; Apaf-1 – faktor koji aktivira apoptozne proteaze; AIF – faktor koji potiče apoptozu; košaperoni: protein koji stupa u interakciju s Hsp70 (HIP, engl. Hsp70-interacting protein); protein koji organizira Hsp70-Hsp90 kompleks (HOP, engl. Hsp70-Hsp90 organizing protein); karboksi kraj proteina koji stupa u interakciju s Hsc70 (CHIP, engl. carboxy terminus of Hsc70 interacting protein). Prilagođeno prema (112).

Temeljna uloga Hsp-ova u oksidacijskom stresu je zaštita stanice. Oksidacijski stres, osim promjena na lipidima i DNA, uzrokuje nakupljanje oksidacijski promijenjenih nefunkcionalnih proteina. To je događaj koji potiče aktivaciju upalnih i apoptoznih signalnih putova u stanici, te sintezu Hsp-ova. Proteini toplinskog šoka na oksidacijski stres djeluju na nekoliko razina: popravak i/ili uklanjanje oštećenih proteina, inhibicija apoptoze i protuupalni učinak (Slika 6) (112).

1.3.3 Proteinske tiolne skupine

Tioli (RSH) su organski spojevi koji sadrže sulfhidrilnu (SH) skupinu. Obično se dijele u one visoke molekulske mase i niskomolekulske tiole. U plazmi se uglavnom nalaze proteinski tioli, dok su koncentracije niskomolekulskih tiola (primjerice GSH, cisteina, homocisteina, cisteinilglicina, gama-glutamilcisteina) u plazmi niske.

Sulfhidrilna skupina je izrazito reaktivna, dobar je reducirajući agens i nukleofil, stoga reagira s mnoštvom ROS-ova i elektrofilnih molekula. Biološka aktivnost tiola ovisi o podložnosti SH skupine da bude oksidirana u disulfidni oblik (R-S-S-R), odnosno o ionizaciji i naboju aminokiselinskih ostataka smještenih u blizini SH skupine, te o njenoj izloženosti u proteinskoj strukturi. Disulfidi su otporni na daljnju oksidaciju što ih čini glavnim produktima oksidacije tiola i pokazateljima oksidacijskog stresa u stanici i tkivima (113,114).

Proteinski tioli su glavni čimbenici *in vivo* antioksidacijskog sustava plazme. Smatra se da su odgovorni za uklanjanje 50-75% stvorenih ROS-ova i RNS-ova. Tiolne skupine proteina spremno i gotovo selektivno reagiraju s reaktivnim spojevima. U uvjetima blagog oksidacijskog stresa, SH skupine se reverzibilno oksidacijski modificiraju pri čemu se uglavnom stvaraju miješani disulfidi proteinskih tiola i niskomolekulskih tiola. Najčešća je reakcija S-glutationilacija uz GSH, a nastali miješani disulfidi mogu izravno mijenjati ili regulirati funkciju proteina, a štite i od ireverzibilne oksidacije. Enzimskim reakcijama, uz disulfid-izomerazu, mitohondrijski glutaredoksin ili tioredoksin, iz reverzibilnih oksidiranih oblika se mogu obnoviti reducirani oblici proteinskih tiola (115).

Koncentracije proteinskih tiola u plazmi osjetljiv su pokazatelj sistemskog oksidacijskog stresa, bilo da se određuju slobodne tiolne skupine ili proteinski disulfidi. Promjene u njihovim koncentracijama primijećene su u različitim patološkim stanjima popraćenim prisutnošću oksidacijskog stresa (ateroskleroza, kardiovaskularne bolesti, šećerna bolest, maligne bolesti). Niske koncentracije tiola koreliraju s povećanim koncentracijama lipidnih peroksida i produkata oksidacije proteina. Dodatno, sve je više dokaza koji upućuju na ulogu tiola u regulaciji metabolizma, prijenosu signala i regulaciji ekspresije gena (84,113,116).

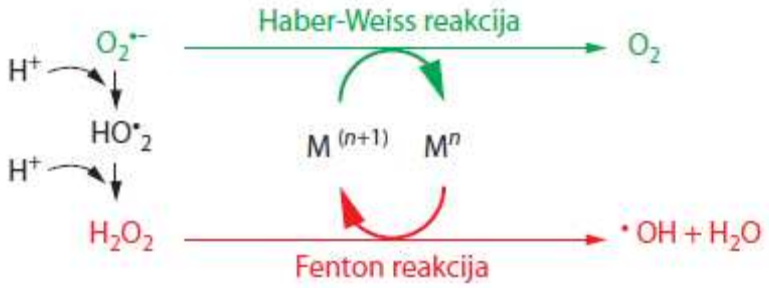
1.3.4 Albumin

Udio albumina u ukupnim proteinima plazme iznosi gotovo 60%, što ga čini glavnim proteinom u plazmi. Molekulska masa mu iznosi 66 kDa, a kod fiziološkog pH se nalazi u stabilnom negativno nabijenom obliku. Poluživot u plazmi mu je 15 do 19 dana u fiziološkim uvjetima, a njegov se katabolizam zbiva pinocitozom u gotovo svim tkivima u organizmu. Sintetizira se u jetri. Glavne fiziološke funkcije albumina obuhvaćaju održavanje koloidno-osmotskog tlaka i prijenos malih hidrofobnih molekula (masne kiseline i lipidi, bilirubin, lijekovi, hormoni, kalcij, ioni željeza i bakra) do mjesta njihovog metabolizma. Dodatno, sudjeluje u reakciji akutne faze kao negativni protein, što znači da njegove koncentracije padaju ne samo zbog smanjene sinteze pod utjecajem IL-6, već i zbog redistribucije u međustaničnu tekućinu uslijed povećane propusnosti kapilara i njegovog povećanog katabolizma u stanicama (117,118).

Antioksidacijska uloga albumina u plazmi je dvojaka. Jedan od mehanizama kojim albumin ostvaruje svoju antioksidacijsku funkciju je vezanje različitih liganda, od kojih su najvažniji ioni prijelaznih metala. Slobodni bakar (Cu^{2+}) i željezo (Fe^{2+}) mogu reagirati s vodikovim peroksidom te u Fentonovoj reakciji stvoriti iznimno reaktivni hidroksilni radikal (Slika 7). Vezanjem za albumin se ograničava njihova dostupnost za sudjelovanje u oksidacijskim reakcijama, a stvoreni radikali usmjereni su na proteinsku strukturu albumina čime se štite važnije molekule. Albumin veže i nezasićene masne kiseline čime ih štiti od oštećenja oksidacijom, i to u sprezi s za albumin vezanim bilirubinom koji djeluje kao inhibitor peroksidacije lipida (119,120).

Nadalje, antioksidacijska funkcija albumina proizlazi iz njegove specifične strukture. U strukturi albumina nalazimo 35 cisteinskih ostataka koji su uključeni u stvaranje 17 disulfidnih veza. Jedina slobodna SH skupina je ona cisteina na poziciji 34 (Cys34) koja je odgovorna za specifična antioksidacijska svojstva albumina u plazmi. Obzirom na visoke koncentracije albumina u plazmi, ova skupina čini 80% slobodnih tiola u plazmi. U fiziološkim uvjetima se jedna trećina albumina nalazi u disulfidnom obliku, dok su dvije trećine dostupne u reduciranom obliku, sa slobodnom tiolnom skupinom na Cys34. Zahvaljujući tome albumin djeluje kao čistač slobodnih radikala, primjerice vodikovog peroksida, peroksinitrita, superoksida i hipoklorne kiseline. Djelovanjem ROS-a na albumin, SH skupina na Cys34 se oksidira do sulfenske kiseline (SOH) koja je središnji međuprodukt u oksidoredukcijskim reakcijama posredovanim albuminom. Sulfenska se skupina može dalje

oksidirati do ireverzibilnih produkata sulfinske (SO_2H) ili sulfonske (SO_3H) kiseline; odnosno reducirati opet u tiolnu ili stvoriti disulfid s GSH (117-119).



Slika 7. Fentonova i Haber-Weissova reakcija.
Reducirani oblik prijelaznih metala (M^n) reagira u Fentonovoj reakciji s vodikovim peroksidom (H_2O_2), pri čemu nastaje hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$). Superoksidni radikal može također reagirati s oksidiranim oblikom prijelaznih metala ($M^{(n+1)}$) u Haber-Weiss-ovoj reakciji, pri čemu se stvara M^n koji se opet uključuje u cikličke oksidoredukcijske reakcije. Prilagođeno iz (121).

1.3.5 Transferin

Transferin je β1-globulin čija je funkcija prijenos željeza u plazmi. Molekulska masa mu je oko 75 kDa, a sintetizira se u pretežno u jetri. Njegove koncentracije u plazmi regulira koncentracija željeza u organizmu – u slučaju snižene koncentracije željeza, koncentracije transferina su povišene. Poluživot mu iznosi 8-10 dana (122).

Temeljna je funkcija transferina prijenos željeza od mjesta njegove apsorpcije do mjesta njegova metabolizma. Željezo apsorbirano iz crijeva ili oslobođeno katabolizmom hemoglobina se oksidira iz Fe^{2+} u Fe^{3+} djelovanjem ceruloplazmina. Apotransferin, koji sadrži dva vezna mjesta za željezo, veže dva iona željeza (Fe^{3+}) čime nastaje transferin (Fe_2-Tf). Tako kompleksirano željezo prenosi se do ciljnih stanica. Procesom endocitoze posredovane transferinskim receptorom, željezo kompleksirano za transferin se s površine stanice unosi u stanicu. Nakon oslobađanja željeza u stanici, apotransferin se reciklira i vraća u cirkulaciju, gdje može opet vezati slobodno željezo (117,123).

Željezo vezano za transferin ne može reagirati s produktima nepotpune oksidacije kisika (vodikovim peroksidom i superoksidnim anionom). Naime, slobodno ili slabo vezano željezo (Fe^{2+}) u Fentonovoj reakciji reagira s vodikovim peroksidom pri čemu se stvara vrlo reaktivan

i štetan hidroksilni radikal, odgovoran za većinu štetnih posljedica oksidacijskog stresa u organizmu. Superoksidni anion može dalje reagirati sa željezom (Fe^{3+}) u Haber-Weissovoj reakciji, pri čemu se obnavlja reducirani Fe^{2+} dostupan za Fentonovu reakciju (Slika 7). Vezanjem željeza za transferin prekida se ovaj ciklus čime se sprječava stvaranje hidroksilnih radikala, odnosno peroksidacija lipida, te oštećenje proteina i DNA koji mogu rezultirati oštećenjem tkiva. Upravo je ta sposobnost transferina da uklanja iz cirkulacije „slobodno" željezo temelj njegove antioksidacijske funkcije. Osim toga, transferin je negativni protein akutne faze, a snižene koncentracije transferina nalaze se ne samo u upalnim, već i u malignim bolestima i bolestima jetre (117,123).

1.3.6 Ceruloplazmin

Ceruloplazmin je α2-globulin molekulske mase 132 kDa koji veže 95% serumskog bakra. Sintetizira se u jetri, a u manjoj mjeri i u slezeni, plućima, testisima i mozgu. Poluživot ceruloplazmina u plazmi je 4-5 dana. Funkcije ceruloplazmina u organizmu su višestruke: vezanje i prijenos bakra do tkiva, feroksidazna aktivnost, uloga u hemostazi, angiogenezi, inaktivaciji biogenih amina i zaštiti od oksidacijskog stresa.

Ceruloplazmin čvrsto veže šest iona bakra na tri različita vezna mjesta na proteinu. Upravo su ta različita vezna mjesta odgovorna za redukciju kisika do vode u kontroliranim uvjetima. Ceruloplazmin može manje čvrsto vezati i dodatnih deset atoma bakra. Slično željezu, slobodni ioni bakra (Cu^{1+} i Cu^{2+}) mogu katalizirati i amplificirati nastanak ROS-a putem Fentonove i Haber-Weiss-ove reakcije (124-126).

Osim u metabolizmu bakra, ceruloplazmin ima ulogu u metabolizmu željeza. U plazmi ima feroksidaznu aktivnost katalizirajući oksidaciju Fe^{2+} u Fe^{3+}, pri čemu omogućava vezanje željeza za apotransferin. Lokalizacijom oksidacije željeza i bakra na ceruloplazminu onemogućeno je stvaranje hidroksilnog radikala iz vodikovog peroksida što inhibira lipidnu peroksidaciju, oštećenje proteina i DNA. Antioksidacijske funkcije ceruloplazmina temelje se na njegovoj feroksidaznoj i kuproksidaznoj aktivnosti, te u manjoj mjeri na GSH-peroksidaznoj aktivnosti. Vezanje bakra za ceruloplazmin je nužno za njegovu feroksidaznu aktivnost koja se smatra glavnom antioksidacijskom funkcijom ceruloplazmina. Pokazano je da može sporo reagirati i sa superoksidnim anionom i vodikovim peroksidom (124,127).

Koncentracije ceruloplazmina rastu 2-3 puta u upali pod utjecajem upalnih citokina i to 4 do 20 dana nakon akutnog podražaja, stoga se ceruloplazmin smatra kasnim pozitivnim proteinom akutne faze (117,124,126).

1.3.7 Ukupni bilirubin

Tetrapirolski je pigment žute boje koji nastaje razgradnjom hema (iz eritrocita, mioglobina, citokroma i peroksidaza). U jetri, slezeni, koštanoj srži i limfnim čvorovima hemoglobin se razgrađuje na hem i globin. Na protoporfirinski prsten djeluje hem-oksidaza iz mikrosoma, čime se iz hema oslobađa željezo (Fe^{3+}). Protoporfirin se oksidira do biliverdina, a ovaj djelovanjem biliverdin-reduktaze reducira u bilirubin. Važno kemijsko svojstvo bilirubina je njegova netopivost u vodi i nepolarnim otapalima iz čega proizlazi njegova toksičnost za organizam. Stoga se u cirkulaciji bilirubin veže za albumin i prenosi do jetre gdje se metabolizira. Međutim, istraživanja su pokazala da nekonjugirani bilirubin ima snažnu antioksidacijsku aktivnost, te da blaga hiperbilirubinemija ima poželjne zaštitne učinke jer bilirubin djeluje antimutageno, antioksidacijski i antiaterogeno. Klinički značaj određivanja bilirubina je u hepatobilijarnim i hemolitičkim bolestima, te u dijagnozi nasljednih hiperbilirubinemija (117,128,129).

Općenito se smatra da se antioksidacijsko djelovanje bilirubina temelji na sposobnosti nekonjugiranog (vezanog za albumin) i konjugiranog bilirubina da sprječavaju oksidacijski stres. Bilirubin u strukturi sadrži niz konjugiranih dvostrukih veza i par reaktivnih vodikovih atoma koji su izravno uključeni u neutraliziranje stvorenih radikala prijenosom vodika (130). Bilirubin izravno djeluje antioksidacijski reakcijom sa slobodnim radikalima, pri čemu se oksidira u biliverdin. Djelovanjem biliverdin-reduktaze biliverdin se ponovno pretvara u bilirubin. Njegova lipofilnost je odgovorna za sprječavanje peroksidacije lipida. Međutim, bilirubin je i snažan inhibitor sinteze superoksida putem mitohondrija jer snažno potiskuje aktivnost mitohondrijske NADPH-oksidaze. To svojstvo bilirubina ublažava oksidacijski stres i ima učinak na višestruke unutarstanične signalne putove regulirane ROS-ovima. Dodatno, bilirubin djeluje i protuupalno smanjujući sintezu upalnih citokina i CRP-a (129,131).

Iako je poznato da koncentracije bilirubina pokazuju obrnuto proporcionalnu povezanost s brojnim upalnim, autoimunosnim i degenerativnim bolestima, molekularni mehanizam kojim bilirubin ostvaruje svoju zaštitnu ulogu nije razjašnjen (132).

1.3.8 Malondialdehid

Peroksidacija lipida je proces u kojem oksidansi ciljano djeluju na lipide koji sadrže polinezasićene masne kiseline (glikolipide, fosfolipide i kolesterol), pri čemu nastaju peroksi-radikali lipida koji dalje potiču reakciju do nastanka hidroperoksida (LOOH). Peroksidacija lipida je lančana reakcija koja završava nastankom krajnjih produkata lipidne peroksidacije. U uvjetima blage peroksidacije lipida, stanica može potaknuti mehanizme aktivacije signalnih putova i obrane koji završavaju njenom prilagodbom na stresni podražaj i preživljenjem. Međutim, kada je učinak peroksidacije lipida citotoksičan, aktiviraju se mehanizmi apoptoze i nekroze stanice što pogoduje patogenezi mnogih poremećaja (120).

Malondialdehid je jedan od krajnjih produkata peroksidacije lipida. Po strukturi je dialdehid sastavljen od 3 atoma ugljika. Nastaje enzimskom i neenzimskom peroksidacijom arahidonske kiseline i drugih polinezasićenih masnih kiselina. *In vivo*, MDA je međuprodukt enzimskih reakcija sinteze tromboksana A2. Taj je biološki put dobro poznat, iako se uloga tako nastalog MDA nije istraživala.

Sinteza MDA neenzimskim putem uvjetovana je djelovanjem kisikovih radikala na dvostruku vezu nezasićenih masnih kiselina u membranskim lipidima. Pri tome se izvlači susjedni vodikov atom što rezultira nastankom slobodnog radikala lipida koji oksidacijom prelazi u peroksi-radikal. Ovaj može reagirati s bliskim membranskim lipidima stvarajući LOOH i slobodni radikal lipida čime se potiče lančana reakcija peroksidacije. Nestabilni se LOOH razlaže na MDA i HNE.

U kliničkom i eksperimentalnom okruženju se MDA koristi kao pokazatelj oksidacijskog stresa. Malondialdehid ima citotoksična, mutagena i karcinogena svojstva. Može vrlo brzo reagirati s mnogim biomolekulama, primjerice DNA ili proteinima, pri čemu nastaju napredni produkti lipidne peroksidacije (ALE, engl. *advanced lipid peroxidation end-products*). Napredni produkti lipidne peroksidacije sudjeluju u sekundarnim reakcijama s biološki važnim molekulama (enzimi, prijenosni proteini, proteini citoskeleta, mitohondrijski i antioksidacijski proteini, te deoksi gvanozin i deoksiadenozin u DNA) pri čemu se mijenja njihova struktura i funkcija, što rezultira posljedicama štetnim po stanicu (121,133-135).

1.3.9 Paraoksonaza 1

Paraoksonaza 1 (PON1) je glikoprotein molekulske mase 45 kDa koji se sintetizira prvenstveno u jetri. Paraoksonaza 1 je esteraza ovisna o vezanju kalcija koja katalizira hidrolizu organofosfata. Nalazimo je u jetri, bubregu, probavnom traktu i serumu. U cirkulaciji se uglavnom nalazi vezana za lipoproteine visoke gustoće (HDL, engl. *high density lipoproteins*) koji stabiliziraju njenu strukturu i osiguravaju okruženje nužno za vezanje supstrata.

Primarna funkcija PON1 je hidroliza toksičnih metabolita organofosfatnih spojeva (insekticida i nervnih plinova), aromatskih estera i različitih aromatskih i alifatskih laktona. Sudjeluje u metabolizmu lipida i nekih lijekova (antibiotika, diuretika, statina), te posjeduje i slabu peroksidaznu i fosfolipaznu aktivnost. Arilesterazna i paraoksonazna aktivnost enzima ovisne su o vezanju kalcija te se potpuno inhibiraju korištenjem kelatora. Nasuprot tome, antioksidacijska aktivnost PON1 nije ovisna o kalciju. Za veliku varijabilnost koncentracija i aktivnosti PON1 u serumu odgovorni su genski (polimorfizmi u promotorskoj i kodirajućoj regiji gena PON1) i okolišni čimbenici (prehrana, unos alkohola, pušenje, okolišni toksini). Na koncentracije i aktivnosti PON1 u serumu utječu i različita fiziološka i patološka stanja.

Serumske aktivnosti PON1 obrnuto su proporcionalne prisutnom oksidacijskom stresu. Čini se da PON1 posjeduje dva aktivna mjesta s različitim antioksidacijskim aktivnostima. Hidrolitičko aktivno mjesto metabolizira supstrate kao što su esterificirani lipidi, a stvoreni se hidroperoksidi reduciraju na drugom aktivnom mjestu na enzimu. Antioksidacijske (antiaterogene) aktivnosti PON1 temelje se na njenoj sposobnosti da hidrolizira oksidirane fosfolipide u plazmi štiteći HDL. Nadalje, štiti i fosfolipide na lipoproteinu niske gustoće (LDL, engl. *low density lipoprotein*) od oksidacije. Antioksidacijski učinci PON1 na LDL imaju i sekundarne posljedice: smanjuje se adhezija monocita na endotelne stanice i smanjuje se kemotaktična aktivnost makrofaga (136-139).

Paraoksonaza 1 se smatra negativnim proteinom akutne faze jer njene koncentracije padaju u upalnom odgovoru, te su obrnuto proporcionalne koncentracijama CRP-a (138).

2 HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Usprkos značajnom napretku u razumijevanju KOPB-a u posljednja dva desetljeća, potpuno razumijevanje patofiziologije ove bolesti još nije razjašnjeno. Područja od posebnog interesa su otkrivanje uzroka i mehanizma bolesti, molekularnih mehanizama upalne reakcije prisutne u KOPB-u, rano otkrivanje bolesti, prepoznavanje biljega bolesti, te razjašnjavanje odnosa KOPB-a i sistemske upale u kontekstu razvoja sistemskih učinaka KOPB-a.

Suvremeno shvaćanje KOPB-a podrazumijeva i sistemsku komponentu bolesti, te se uz parametre plućne funkcije, koji su "zlatni standard" u dijagnozi i klasifikaciji KOPB-a, javlja potreba za pronalaskom specifičnijih i dostupnijih pokazatelja bolesti. Otkrivanje alternativnih pokazatelja bolesti, koji bi omogućili bolje razumijevanje sistemskog oksidacijskog procesa u KOPB-u, može biti od koristi u dijagnostici, klasifikaciji i praćenju tijeka bolesti te omogućiti razvoj novih individualiziranih terapijskih pristupa.

Naše se istraživanje temelji na hipotezi da je kod bolesnika s KOPB-om prisutna sistemska upala i sistemski poremećaj ravnoteže oksidansa i antioksidansa. Osim toga, smatramo da postoji povezanost između pokazatelja sistemskih poremećaja u KOPB-u i težine bolesti (odnosno tradicionalnih pokazatelja plućne funkcije), te pušačkog statusa bolesnika s KOPB-om. Sistemski biljezi upale i oksidacijskog stresa, određeni iz lako dostupnih uzoraka periferne krvi i koristeći metode koje se mogu standardizirati i automatizirati, mogu biti korisni u dijagnozi i predviđanju prisutnosti bolesti.

Sukladno tome, općeniti cilj ovog istraživanja bio je istražiti poremećaj ravnoteže sistemskih oksidansa i antioksidansa u bolesnika sa stabilnim oblikom KOPB-a te ispitati povezanost sistemskih antioksidansa s poremećajem funkcije pluća i biljezima sistemske kronične upale.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

- ispitati koncentracije pokazatelja sistemskog oksidacijskog stresa (albumin, transferin, ceruloplazmin, ukupni bilirubin, slobodne tiolne skupine, MDA, PON1) u bolesnika s KOPB-om i u zdravih ispitanika;
- ispitati povezanost pokazatelja sistemskog oksidacijskog stresa s poremećajem plućne funkcije;

- obzirom da neki od pokazatelja imaju dvojnu ulogu (antioksidansi i pozitivni/negativni proteini akutne faze), odrediti koncentracije općih upalnih biljega (leukocita, CRP-a, fibrinogena) te ispitati njihovu povezanost s plućnim i oksidacijskim parametrima u bolesnika s KOPB-om i u zdravih ispitanika;
- u leukocitima bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika ispitati promjene u ekspresiji i/ili aktivaciji signalnih molekula Hsp70 i Hsp27 te MAP kinazama (ERK, JNK, p38);
- ispitati utjecaj težine bolesti (prema GOLD klasifikaciji) i pušenja na pokazatelje sistemskog oksidacijskog stresa i upale;
- ispitati dijagnostičku učinkovitost pokazatelja sistemskog oksidacijskog stresa i njihovu sposobnost u predviđanju prisutnosti KOPB-a.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Ispitanici

U ispitivanje je uključeno 110 bolesnika sa stabilnim oblikom KOPB-a. Dijagnoza je postavljena po primitku ispitanika u Kliniku za plućne bolesti Jordanovac Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Zagreb) i na Odjel za pulmologiju Opće bolnice „Dr. Ivo Pedišić“ (Sisak). Kontrolna skupina se sastojala od 50 zdravih dobrovoljaca iz istog geografskog područja (grad Zagreb i Zagrebačka županija te Sisačko-moslavačka županija), koji su u istraživanje uključeni od strane svojih liječnika obiteljske medicine.

Ispitanici s nepotpunim demografskim podacima i nedovoljnim volumenom uzorka za analizu (N=9) su odmah isključeni iz daljnjeg istraživanja, ostavljajući ukupno 106 bolesnika sa stabilnom KOPB i 45 zdravih ispitanika za daljnju obradu.

Ispitanicima su prikupljeni anamnestički i demografski podaci, te su im utvrđene pušačke navike. Ispitanici su podijeljeni u tri skupine ovisno o pušačkim navikama: pušači, bivši pušači i nepušači. Pušačima su definirani ispitanici koji su pušili više od dvije cigarete dnevno ili su prestali pušiti u razdoblju do 6 mjeseci od trenutka uključivanja u istraživanje. Bivši pušači su bili ispitanici s pozitivnom poviješću pušenja, koji su prestali pušiti u razdoblju dužem od 6 mjeseci od trenutka uključivanja u istraživanje. Nepušači su ispitanici koji nisu nikad pušili.

Temeljni kriterij uključivanja u istraživanje bila je potvrdna dijagnoza KOPB-a. Kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest je dijagnosticirao specijalist pulmolog, temeljem anamneze, prisutnih simptoma i nalaza plućne funkcije (spirometrijskih mjerenja), a prema kriterijima GOLD smjernica. Za postavljanje konačne dijagnoze KOPB-a koristila se granična vrijednost $FEV_1/FVC < 70\%$ nakon bronhodilatacije. Bolesnici su zatim podijeljeni u 3 skupine ovisno o težini bolesti (GOLD II: $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ predviđene vrijednosti; GOLD III: $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ predviđene vrijednosti; GOLD IV: $FEV_1 < 30\%$ predviđene vrijednosti). Svi su ispitanici bili u stabilnoj fazi bolesti najmanje 3 mjeseca prije uključivanja u istraživanje.

Potvrđena prisutnost plućne bolesti različite od KOPB-a, poput astme, zatim prisutnost upalnih bolesti, infekcija, bubrežne, gastrointestinalne, endokrine, jetrene bolesti i malignih

oboljenja, te egzacerbacija KOPB-a, smatrali su se kriterijima isključivanja iz istraživanja. Kriteriji isključivanja su podrazumijevali i kroničnu konzumaciju alkohola (> 40 g/dan).

Terapija bolesnika s KOPB-om uključivala je bronhodilatatore, antikolinergike, teofilin i inhalacijske kortikosteroide. Zdravi ispitanici nisu primali nikakvu terapiju.

Istraživanje je provedeno u skladu sa smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i etičke principe Helsinške deklaracije. Svi ispitanici uključeni u istraživanje su nakon upoznavanja s detaljima istraživanja potpisali pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Opće bolnice „Dr. Ivo Pedišić“ u Sisku te Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2 Uzorci

Uzorci periferne venske krvi za potrebe istraživanja uzorkovani su ujutro, između 7 i 9 sati. Svi su ispitanici bili natašte. Za potrebe istraživanja korištene su epruvete s podtlakom. Svakom ispitaniku uzorkovane su četiri vrste epruveta: 1) epruveta s K_2EDTA antikoagulansom (za hematološke pretrage); 2) epruveta s natrijevim-citratom (za koagulacijske pretrage); 3) epruveta s litijevim heparinom (za izolaciju polimorfonuklearnih leukocita); 4) epruveta bez antikoagulansa (za biokemijske pretrage).

Uzorci za koagulacijske i biokemijske pretrage centrifugirani su unutar dva sata od uzorkovanja 15 minuta na 4000 okretaja/minuti, odnosno 10 minuta na 3500 okretaja/minuti.

Uzorci pune krvi za određivanje hematoloških parametara analizirani su odmah po uzorkovanju. C-reaktivni protein je određen iz seruma odmah nakon centrifugiranja. Izolacija leukocita izvršena je neposredno nakon uzorkovanja.

Alikvoti uzoraka seruma za određivanje pokazatelja oksidacijskog stresa, odnosno plazme za određivanje fibrinogena, odvojeni su po centrifugiranju i pohranjeni na temperaturi od -20 ºC do analize. Lizati leukocita su po završenom postupku izolacije odvojeni te pohranjeni na temperaturi od -20 ºC do daljnje analize.

3.3 Metode

3.3.1 Određivanje hematoloških pretraga

Iz uzorka pune krvi određen je ukupni broj leukocita ($x10^9$/L), te udjeli neutrofila, monocita i limfocita (%), koristeći automatiziranu metodu na hematološkom analizatoru CELL-DYN 3200CS (Abbott Diagnostics, Abbot Park, SAD).

3.3.2 Određivanje koncentracije C-reaktivnog proteina

Koncentracija CRP-a (mg/L) u serumu određena je standardiziranom imunoturbidimetrijskom metodom na automatiziranom biokemijskom analizatoru Dimension Xpand Plus (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, SAD) koristeći originalne reagense proizvođača.

3.3.3 Određivanje koncentracije fibrinogena

Koncentracija fibrinogena (g/L) određena je iz uzorka plazme metodom po Clauss-u na automatskom koagulometru Sysmex CA1500 (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) koristeći originalne reagense proizvođača.

3.3.4 Određivanje koncentracije lipidnih parametara

Koncentracije triglicerida (mmol/L) i ukupnog kolesterola (mmol/L) određene su iz seruma na automatskom analizatoru Alcyon 300 (Abbott Diagnostics, Abbot Park, SAD) koristeći komercijalno dostupne reagense tvrtke Dijagnostika d.o.o (Sisak, Hrvatska). Koncentracija HDL-a (mmol/L) određena je iz seruma na automatskom biokemijskom analizatoru Dimension Xpand Plus (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, SAD) koristeći originalne reagense proizvođača. Koncentracija LDL-a izračunata je koristeći Friedwald-ov izračun: LDL (mmol/L) = ukupni kolesterol – HDL – (trigliceridi/2,2).

3.3.5 Određivanje koncentracije pokazatelja oksidacijskog stresa

Koncentracije albumina (g/L), transferina (g/L) i ukupnog bilirubina (μmol/L) određene su iz uzorka seruma standardnim laboratorijskim metodama na automatskom biokemijskom analizatoru Olympus AU2700 (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) koristeći originalne reagense proizvođača.

Koncentracija ceruloplazmina (mg/L) određena je iz uzorka seruma imunonefelometrijskom metodom na automatskom analizatoru BN II System analyser (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA) koristeći originalne reagense proizvođača.

Koncentracija slobodnih proteinskih tiolnih skupina (mmol/L) određena je iz seruma spektrofotometrijskom metodom koristeći Ellmanov reagens (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB) (140). Ukratko, slobodne tiolne skupine reagiraju s DTNB-om, pri čemu se oslobađa 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB), čiji je anion kod alkalnog i neutralnog pH žuto obojen. Apsorbancija oslobođenog aniona TNB-a mjeri se spektrofotometrijski na 412 nm, a intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji slobodnih tiolnih skupina u uzorku.

Koncentracija MDA (mmol/L) određena je iz uzorka seruma modificiranom metodom prema Druryu i sur. (141). Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA) pri čemu nastaje crveni kompleks MDA-TBA_2 koji se određuje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) prema Domijan i sur. (142). Specifičnost reakcije povećana je detekcijom HPLC-om koji omogućava odvajanje kompleksa MDA-TBA_2 od ostalih komponenti u reakcijskoj smjesi koje također apsorbiraju na istoj valnoj duljini. Ukratko, uzorku seruma/standarda volumena 50 μL doda se 400 μL fosfatne kiseline (0,1%) i 100 μL TBA (0,6%). Reakcijska se smjesa promiješa i inkubira u termostatskom bloku na temperaturi 90 ºC u trajanju od 30 minuta. Prethodno određivanju HPLC-om, reakcija se zaustavlja stavljanjem uzoraka na led. U sustav HPLC-a (Knauer, Berlin, Njemačka) injektira se 100 μL uzorka. Visokotlačna pumpa potiskuje mobilnu fazu (50 mmol/L KH_2PO_4 (Merck) i metanola (Kemika) u omjeru 60:40, pH 6,8) s uzorkom preko stacionarne faze (pred-kolona i analitička kolona obrnute faze C-18 (LiChrospher, Merck) s česticama veličine 5 μm; dimenzija 4,0 x 4,0 mm, odnosno 4,0 x 125,0 mm) brzinom od 1 mL/minuti, pri čemu se tvari razdvajaju, a različita vremena retencije bilježi detektor. Valne duljine fluorescentnog detektora su

podešene na $527_{ex}/551_{em}$ nm. Fluorescencija je proporcionalna koncentraciji MDA u uzorku. Koncentracija MDA se očitava iz kalibracijske krivulje načinjene koristeći 1,1,3,3-tetrametoksi propan (TMP) kao standard.

3.3.6 Određivanje aktivnosti PON1 u serumu

Aktivnosti PON1 u serumu određene su koristeći dvije vrste supstrata: paraokson za mjerenje paraoksonazne aktivnosti i fenilacetat za mjerenje arilesterazne aktivnosti.

Paraoksonazna aktivnost (PON1) određena je koristeći 15 μL uzorka seruma kojemu je dodano 300 μL reagensa (2,5 mmol/L paraoksona, 1,0 mol/L NaCl, 2,2 mmol/L $CaCl_2$ u 0,1 mol/L Tris-HCl puferu, pH 8,0). Paraoksonaza 1 hidrolizira supstrat paraokson (O,O–dietil–O–*p*–nitrofenilfosfat) pri čemu se oslobađa *p*–nitrofenol. Aktivnost PON1 u serumu određena je kontinuiranim mjerenjem oslobođenog *p*–nitrofenola pri valnoj duljini 410/480 nm u prisutnosti NaCl-a na biokemijskom analizatoru Olympus AU600 (Beckman Coulter, Brea, SAD).

Arilesterazna aktivnost PON1 (ARE) određena je u reakcijskoj smjesi 200 μL supstrata (3,26 mmol/L fenilacetata u 20 mmol/L Tris-HCl pufera s 1,0 mmol/L $CaCl_2$, pH 8,0) i 20 μL razrijeđenog uzorka u istom puferu (1:80). Paraoksonaza 1 hidrolizira supstrat fenilacetat pri čemu nastaje fenol koji se određuje spektrofotometrijski. Kontinuirano mjerenje oslobođenog fenola vrši se na 37 °C koristeći čitač pločica VICTOR3 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, SAD) pri valnoj duljini od 270 nm tijekom 4 minute u 8 ciklusa po 30 sekundi prema destiliranoj vodi. Vrijednosti arilesterazne katalitičke aktivnosti PON1 korigirane su za vrijednosti spontane hidrolize supstrata (143).

3.3.7 Izolacija leukocita i priprema lizata

Za izolaciju leukocita iz pune krvi korištena je metoda po Percyu i Bradyu. U plastičnu se epruvetu punoj krvi (5 mL), uzetoj na litijev-heparin, doda 1 mL otopine dekstrana (pripremljenoj s 0,5 g dekstrana (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) koji se otopa u 10 mL 7 g/L natrijevog klorida). Sadržaj se lagano promiješa (pazeći da ne dođe do hemolize) i ostavi stajati na sobnoj temperaturi 60 minuta. Pri tome dolazi do sedimentacije eritrocita, a kako se dekstranom povećava gustoća medija, leukociti se ne talože između eritrocita i plazme (engl. *buffy-coat*), već ostaju suspendirani u nadsloju. Nadsloj bogat leukocitima se pažljivo odvoji u

drugu epruvetu i centrifugira u centrifugi s hlađenjem (EBA 12 R, Hettich Zentrifugen) na temperaturi od 4 ºC, 10 minuta na 1900 okretaja/minuti. Nakon uklanjanja nadsloja, u talogu ostaje fina mrežica leukocita s nešto eritrocita. Onečišćenje eritrocitima uklanja se koristeći hipotoničnu otopinu natrijevog klorida (NaCl). Talog se resuspendira u 1 mL hladne otopine 9 g/L NaCl. Dodatkom 3 mL ledeno hladne destilirane vode i laganim miješanjem 45 sekundi, a nakon toga dodatkom 3 mL hladne otopine 18 g/L NaCl i miješanjem dodatnih 45 sekundi, postiže se uklanjanje zaostalih eritrocita. Suspenzija se centrifugira na 1900 okretaja/minuti, 10 minuta na 4 ºC. Nadsloj se nakon centrifugiranja odbacuje, a postupak s hipotoničnom otopinom ponavlja još dva puta.

Nakon završenog postupka izolacije, leukociti se resuspendiraju u 150 μL ledeno hladnog lizirajućeg pufera (50 mM TRIS-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 1% Nonindent P-40, 10% glicerol uz dodatak tablete proteaznog inhibitora „Complete protease inhibitor“ tvrtke Roche) i ostave stajati 20 minuta na ledu. Zatim se stanice liziraju na 50 W tri puta u trajanju od 15 sekundi, upotrebom ultrazvučnog homogenizatora serije 4710 (Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, SAD). Lizat se centrifugira na temperaturi od 4 ºC, 20 minuta na 14000 okretaja/minuti. Jedan alikvot lizata leukocita (10 μL) je pohranjen na temperaturi od – 20˚C za potrebe određivanja koncentracije proteina u lizatu. Ostatku lizata leukocita se dodao 6 puta 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 su prokuhani 5 minuta na 97˚C, ohlađeni na ledu i pohranjeni na temperaturi od – 20 ˚C. Tako pripremljeni uzorci spremni su za nanošenje na SDS-poliakrilamidni gel i Western blot analizu.

3.3.8 Određivanje koncentracije proteina u lizatu leukocita

Koncentracija proteina u lizatu leukocita određena je metodom po Lowryu. Metoda se temelji na reakciji peptidnih veza s bakrom (biuret reakcija). Tirozin, triptofan i kompleks proteina s bakrom reduciraju fosfomolibdat i fosfovolframat iz fenolnog reagensa u modre produkte. Intenzitet nastalog obojenja se određuje spektrofotometrijski na 630 nm i proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku. Standardi za izradu kalibracijske krivulje izrađeni su koristeći goveđi serumski albumin (BSA, engl. *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Uzorak/standard (100 μL) se inkubirao na sobnoj temperaturi s 500 μL radnog reagensa (2% natrijev karbonat u 0,1 M NaOH, 2% K,Na-tartarat, 1% bakreni sulfat) u trajanju 10 minuta. Zatim se smjesi dodao Folin-Ciocalteov fenolni reagens (25 μL)

(Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), reakcijska je smjesa promiješana i inkubirana na sobnoj temperaturi 20-30 minuta. Iz apsorbancija standarda očitanih koristeći spektrofotometar Pye Unicam SP1750 (Unicam Instruments Ltd., Cambridge, Velika Britanija) načinjena je kalibracijska krivulja, a zatim je iz apsorbancije uzoraka uz kalibracijsku krivulju određena koncentracija proteina u uzorcima. Dobiveni rezultati (mg/mL) pomnoženi su s razrjeđenjem (omjer volumena razrijeđenog reagensa i uzorka).

3.3.9 Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu i Western blot analiza

Proteini iz lizata leukocita razdvojeni su temeljem molekulske mase koristeći okomitu diskontinuiranu elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*).

Za elektroforezu proteina u SDS-poliakrilamidnom gelu korišten je 4%-tni sabijajući gel, te 13,5%-tni razdvajajući gel (za analizu ekspresije Hsp27), odnosno 10%-tni razdvajajući gel (za analizu ekspresije Hsp70), te 12%-tni razdvajajući gel (za analizu ekspresije i aktivacije MAPK).

Sabijajući gel (4%-tni) pripremljen je iz 6,1 mL ultračiste vode, 2,5 mL pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), 100 μL 10% otopine natrijevog dodecilsulfata (SDS), 1,3 mL 30%-tne otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 μL 10%-tne otopine amonijevog persulfata i 10 μL tetrametil-etilen-diamina (TEMED).

Za pripremu 13,5%-tnog razdvajajućeg gela korišteno je 4,25 mL ultračiste vode, 2,5 mL pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 100 μL 10%-tnog SDS-a, 4,5 mL 30%-tne otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 μL 10%-tne otopine amonijevog persulfata i 5 μL TEMED-a.

Za pripremu 10%-tnog razdvajajućeg gela korišteno je 4,35 mL ultračiste vode, 2,5 mL pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 100 μL 10%-tnog SDS-a, 3 mL 30%-tne otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 μL 10%-tne otopine amonijevog persulfata i 5 μL TEMED-a.

Naposljetku, za pripremu 12%-tnog razdvajajućeg gela korišteno je 3,35 mL ultračiste vode, 2,5 mL pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 100 μL 10%-tnog SDS-a, 4 mL 30%-tne otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 μL 10%-tne otopine amonijevog persulfata i 5 μL TEMED-a.

Volumen uzorka koji se nanosio na gel za elektroforezu odgovarao je koncentraciji proteina od 50 μg. Elektroforeza se provodila u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,25 M glicin, 0,1%-tna otopina SDS-a) uz napon od 100 V tijekom 90 minuta. Kao standard za određivanje molekulske mase proteina korišten je MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen Corporation, Carlsbad, SAD) koji na gelu daje 9 obojenih proteinskih vrpci u rasponu od 4 do 250 kDa.

Nakon razdvajanja proteina SDS-PAGE metodom, razdvojene su vrpce prenesene na nitroceluloznu membranu kako bi se omogućila specifična detekcija razdvojenih proteina koristeći specifična antitijela (Western blot analiza).

Prijenos proteina na membranu izveden je koristeći uređaj za elektro-prijenos proteina Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, SAD) pri jakosti struje od 250 mA kroz 90 minuta. Provjera uspješnosti prijenosa proteina na membranu učinjena je bojanjem ostatnih gelova s 0,1%-tnom otopinom Coomassie plavila R-250 u smjesi 40%-tnog metanola i 10%-tne octene kiseline. Uklanjanje suviška boje je izvršeno uranjanjem gela u otopinu u 40%-tnog metanola i 10%-tne octene kiseline u destiliranoj vodi. Gelovi su nakon bojanja vizualno pregledani.

Nakon izvršenog prijenosa na membranu, ova je blokirana uranjanjem u pufer za blokiranje (1%-tni BSA i 1%-tni kokošji albumin u puferu za ispiranje - 25 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05%-tna Tween20 u ultračistoj vodi) kroz 60 minuta. Time je onemogućeno nespecifično vezanje antitijela u sljedećim koracima analize.

Membrana se zatim inkubirala preko noći na 4 ºC sa specifičnim primarnim antitijelima za ciljni protein kako slijedi:

- za detekciju Hsp27 korištena su anti-Hsp27 kunićja poliklonska antitijela (Hsp27, pAb; Enzo Life Sciences, Farmingdale, SAD) (razrjeđenje 1:5000 u puferu za blokiranje);
- za detekciju Hsp70 proteina korištena su anti-Hsp70 mišja monoklonska antitijela (HSP70/HSP72, mAb; Enzo Life Sciences, Farmingdale, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje);
- za detekciju ukupnog ERK (ERK1 i ERK2 kinaze) korištena su anti-ERK1 (C-16) kunićja poliklonska antitijela (ERK 1 (C-16); Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje);

- za detekciju fosforilirane ERK korištena su anti-ERK-P kunićja poliklonska antitijela (Anti-ACTIVE MAPK pAb; Promega Corporation, Madison, SAD) (razrjeđenje 1:5000 u puferu za blokiranje);
- za detekciju ukupnog proteina p38 korištena su anti-p38 (C-20) kunićja poliklonska antitijela (p38α (C-20); Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje);
- za detekciju fosforilirane p38 korištena su anti-p38-P kunićja poliklonska antitijela (Anti-ACTIVE p38 pAb; Promega Corporation, Madison, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za blokiranje);
- za detekciju ukupnog proteina JNK (JNK1 i JNK2) korištena su anti-JNK1 (FL) kunićja poliklonska antitijela (JNK (FL); Santa Cruz Biotechnology, Dallas, SAD) (razrjeđenje 1:800 u puferu za blokiranje);
- za detekciju fosforilirane JNK korištena su anti-JNK-P kunićja poliklonska antitijela (Anti-ACTIVE JNK pAb;Promega Corporation, Madison, SAD) (razrjeđenje 1:5000 u puferu za blokiranje).

Nakon inkubacije s primarnim antitijelom, membrana se ispirala tri puta po 15 minuta koristeći pufer za ispiranje (25 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,05 %-tni Tween20 u ultračistoj vodi).

Nakon toga je membrana inkubirana koristeći sekundarno antitijelo obilježeno peroksidazom (iz hrena) koje se veže za epitope primarnih antitijela. Korištena su sljedeća sekundarna antitijela:

- za detekciju kunićjih antitijela (kod analize ekspresije i aktivacije MAPK i ekspresije Hsp27) korištena su obilježena antitijela iz seruma magarca (ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from donkey); GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) (razrjeđenje 1:4000 u 5%-tnoj otopini obranog mlijeka u prahu u puferu za ispiranje);
- za detekciju mišjih antitijela (kod analize ekspresije Hsp70) korištena su obilježena antitijela iz seruma ovce (ECL Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody (from sheep); GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) (razrjeđenje 1:4000 u 5%-tnoj otopini obranog mlijeka u prahu u puferu za ispiranje).

Po završetku inkubacije sa sekundarnim antitijela, membrana se ispire puferom za ispiranje (3 x 15 minuta, a nakon toga još 2 x 10 minuta), a vizualizacija proteinskih vrpci postiže se inkubacijom membrane tijekom 1 minute u mraku s komercijalno dostupnim reagensom za pojačanu kemiluminescenciju (ECL Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Enzim u prisutnosti kemiluminescentog supstrata emitira svjetlo, što omogućava vizualizaciju proteinskih vrpci (tamne pruge) prislanjanjem membrane na autoradiografski film (Lumi-Film Chemiluminescent Detection film, Roche, Indianapolis, SAD) koji se razvija koristeći odgovarajuće kemikalije (GBX developer/replenisher i GBX fixer/replenisher; Kodak; Sigma-Aldrich). Intenzitet signala proteina određuje se denzitometrijski koristeći programsku podršku ScionImage Software for Windows (Scion Corporation, Frederick, SAD).

Nakon denzitometrijskog određivanja su membrane inkubirane 30 minuta na 65 ºC u puferu za skidanje (100 mmol/L β-merkaptoetanola, 2% SDS-a, 62,5 mmol/LTris-HCl pH6,7) kako bi se uklonila antitijela vezana u prvom koraku. Zatim su membrane dodatno inkubirane s anti-aktin mišjim monoklonskim antitijelom iz ptičjeg želuca (β-Actin (C4); Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za blokiranje) za detekciju β-aktina istovjetnom metodom.

Rezultati denzitometrijske analize dobivenih vrpci izraženi su u relativnim denzitometrijskim jedinicama.

3.4 Statistička analiza

Kolmogorov-Smirnovljev test korišten je za testiranje normalnosti raspodjele svih kvantitativnih varijabli. Varijable s normalnom raspodjelom prikazane su koristeći srednju vrijednost i standardnu devijaciju (SD), dok su varijable čija je raspodjela odstupala od normalne prikazane medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR). Dob je, bez obzira na raspodjelu, prikazana medijanom i rasponom (minimum - maksimum). Kategoričke varijable su prikazane cijelim brojem i udjelom (N, %).

Statistički značajna razlika između dvije skupine kvantitativnih varijabli s normalnom raspodjelom ispitana je parametrijskim t-testom, dok je značajnost razlike između dvije skupine varijabli čija je raspodjela odstupala od normalne, odnosno ako je broj ispitanika u skupini bio manji od 30, ispitana neparametrijskim Mann-Whitneyevim testom.

Statistički značajna razlika između više od dvije skupine kvantitativnih varijabli ispitana je koristeći analizu varijance (ANOVA, engl. *analysis of variance*) statistički test (kada su varijable slijedile normalnu raspodjelu), odnosno neparametrijski Kruskall-Wallis test (kada varijable nisu slijedile normalnu raspodjelu i kada je u skupini bilo manje od 30 ispitanika). Samo u slučaju utvrđivanja prisutnosti statistički značajne razlike između ispitivanih skupina, učinjeno je post hoc testiranje Student-Newman-Keulsovim testom, kojim je ispitano postojanje razlike između pojedinačnih parova skupina.

Za ispitivanje statistički značajne razlike između skupina kategoričkih varijabli primijenjen je hi-kvadrat test.

Linearna povezanost (korelacija) varijabli iz različitih skupina ispitana je koristeći linearnu regresijsku analizu. Dobiveni koeficijenti determinacije preračunati su u koeficijente korelacije radi lakše interpretacije rezultata. Koeficijent korelacije je tumačen samo kada je $P < 0,05$, a jačina povezanosti interpretirana je sukladno Tablici 4 (144).

Tablica 4. Interpretacija koeficijenta korelacije

Interpretacija	**r**
nema povezanosti	0 - 0,25
slaba povezanost	0,26 - 0,50
umjerena do dobra povezanost	0,51 - 0,75
vrlo dobra do izvrsna povezanost	0,76 - 1,00

Dijagnostička učinkovitost pojedinih varijabli u diskriminaciji zdravih i bolesnih ispitana je ROC analizom (ROC, engl. *receiver operating characteristic*) i usporedbom dobivenih površina ispod ROC-krivulje (AUC, engl. *area under curve*). Nakon toga je učinjena regresijska analiza. Prvo su u univarijatnoj regresiji identificirane varijable koje su bile statistički značajne u predviđanju ishoda. Varijable su opisane koristeći omjer izgleda (OR, engl. *odds ratio*) i pripadajući 95%-tni interval pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*). Omjer izgleda veći od 1 ukazuje da testirana varijabla povećava izglede prisutnosti ispitivanog ishoda, a ako je $OR < 1$ ispitivana varijabla smanjuje izglede prisutnosti ispitivanog ishoda. Nakon identifikacije statistički značajnih varijabli u univarijatnoj analizi, statistički značajne varijable su uključene su u multivarijatnu regresijsku analizu (model). Varijable koje su nakon multivarijatne analize zadržale statističku značajnost smatrane su statistički značajnim prediktorima ishoda u modelu. Dodana diskriminacijska vrijednost ispitanih modela uspoređena je koristeći dobiveni AUC.

Statistička obrada podataka načinjena je koristeći programski paket MedCalc for Windows, verzija 12.4.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Opće karakteristike ispitanika

Demografske i kliničke karakteristike zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om uključenih u istraživanje prikazane su u Tablici 5.

Bolesnici s KOPB-om su bili stariji od zdravih ispitanika ($P < 0,001$). Udio žena i muškaraca u objema ispitivanim skupinama se razlikovao ($P < 0,001$): muškaraca je bilo više u skupini bolesnika s KOPB-om. Udio pušača, bivših pušača i nepušača nije se razlikovao u ispitivanim skupinama. Bolesnici s KOPB-om pokazali su veći intenzitet pušenja ($P = 0,002$).

Poremećaj plućne funkcije, izražen spirometrijskim parametrima, bio je teži u skupini bolesnika s KOPB-om (FEV_1 i FEV_1/FVC su bili statistički značajno niži u usporedbi sa zdravim ispitanicima). Bolesnici s KOPB-om pokazali su nižu vrijednost BMI-a ($P < 0,001$). Zdravi ispitanici su pokazali prekomjernu, dok su bolesnici s KOPB-om imali idealnu težinu. Koncentracije triglicerida, ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola bile su niže u skupini bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($P < 0,001$). Svi ispitivani parametri lipidnog statusa su u skupini bolesnih ispitanika bili unutar preporučenih vrijednosti, dok su kod zdravih ispitanika koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola bile iznad preporučenih vrijednosti za referentnu populaciju. Koncentracije HDL-kolesterola nisu se razlikovale usporedbom zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om.

Tablica 5. Demografske karakteristike i plućna funkcija zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om

	zdravi ispitanici (N=45)	**bolesnici s KOPB-om (N=106)**	**P**
dob, godine	51 (39 - 84)	71 (39 - 83)	**< 0,001**
spol			
M, N (%)	20 (44)	80 (75)	**< 0,001**
Ž, N (%)	25 (56)	26 (25)	
pušači, N (%)	16 (36)	32 (30)	0,604
bivši pušači, N (%)	13 (28)	27 (26)	
nepušači, N (%)	16 (36)	47 (44)	
pušenje *(pack years)*	20 (15 - 31)	50 (31 - 73)	**0,002**
FEV_1 (% pred.)	105,7 ± 15,9	40,3 ± 14,5	**< 0,001**
FEV_1/FVC (%)	86,0 ± 6,6	61,9 ± 10,7	**< 0,001**
BMI (kg/m^2)	28 ± 4	24 ± 5	**< 0,001**
trigliceridi (mmol/L)	1,7 (1,1 – 2,5)	1,1 (0,8 – 1,4)	**< 0,001**
kolesterol, ukupni (mmol/L)	5,5 ± 1,0	4,9 ± 1,1	**< 0,001**
HDL kolesterol (mmol/L)	1,5 (1,2 – 1,7)	1,5 (1,1 – 1,8)	0,935
LDL kolesterol (mmol/L)	3,2 (2,4 – 3,7)	2,8 (2,3 – 3,4)	**0,025**

Kvalitativni podaci su prikazani kao brojevi (%), dok su kvantitativni prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) i aritmetička sredina ± standardna devijacija. Dob je prikazana kao medijan (raspon).
Pack years predstavlja mjeru intenziteta pušenja, a izračunat je kao umnožak prosječnog broja popušenih cigareta dnevno i broja godina pušenja podijeljen s brojem cigareta u kutiji (20). BMI – indeks tjelesne mase, izračunat kao kvocijent težine (kg) i visine (m) na kvadrat. Statistički značajna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Podebljane su statistički značajne razlike u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Tablica 6 prikazuje opće karakteristike bolesnika podijeljenih ovisno o težini bolesti (GOLD klasifikaciji). U skupinama ovisno o težini bolesti nije nađena statistički značajna razlika u udjelima muškaraca i žena. Bolesnici s vrlo teškim oblikom KOPB-a (GOLD IV) bili su mlađi od bolesnika s umjerenim i teškim oblikom bolesti (GOLD II i GOLD III) (P = 0,005). Navike i intenzitet pušenja nisu se razlikovali usporedbom bolesnika s umjerenim, teškim i vrlo teškim oblikom KOPB-a. Vrijednosti parametara plućne funkcije i BMI-a bile su najniže kod bolesnika s vrlo teškim oblikom KOPB-a (GOLD IV skupina bolesnika). Koncentracije lipidnih parametara nisu se razlikovale usporedbom skupina bolesnika ovisno o težini bolesti (143,145).

Tablica 6. Demografske karakteristike i plućna funkcija bolesnika s KOPB-om ovisno o težini bolesti

	GOLD II (N=28)	**GOLD III (N=49)**	**GOLD IV (N=29)**	**P**
dob, godine	73 (46 - 82)	73 (49 - 83)	69 (39 - 80)	**0,005[a]**
spol				
M, N (%)	22 (79)	34 (69)	24 (83)	0,212
Ž, N (%)	6 (21)	15 (31)	5 (17)	
pušači, N (%)	7 (25)	13 (27)	12 (41)	0,607
bivši pušači, N (%)	8 (29)	12 (24)	7 (24)	
nepušači, N (%)	13 (46)	24 (49)	10 (35)	
pušenje (*pack years*)	43 (30 – 64)	50 (36 - 90)	40 (32 - 64)	0,655
FEV_1 (% pred.)	59 (53 - 63)	41 (36 - 45)	24 (20 - 25)	**< 0,001[b]**
FEV_1/FVC (%)	65,7 (62,0 – 71,8)	63,9 (57,5 – 67,4)	57,4 (49,3 – 63,1)	**0,001[c]**
BMI (kg/m^2)	25 (23 - 28)	25 (22 - 28)	22 (20 - 25)	**0,021[c]**
trigliceridi (mmol/L)	1,0 (0,8 – 1,2)	1,0 (0,8 – 1,4)	1,1 (0,8 – 1,5)	0,509
kolesterol, ukupni (mmol/L)	4,8 ± 1,2	4,9 ± 1,1	4,9 ± 1,1	0,871
HDL kolesterol (mmol/L)	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,5 ± 0,6	0,528
LDL kolesterol (mmol/L)	2,9 ± 1,0	2,9 ± 1,0	2,8 ± 0,7	0,949

Kvalitativni podaci su prikazani kao brojevi (%), dok su kvantitativni prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) i aritmetička sredina ± standardna devijacija. Dob je prikazana kao medijan (raspon).

Pack years predstavlja mjeru intenziteta pušenja, a izračunat je kao umnožak prosječnog broja popušenih cigareta dnevno i broja godina pušenja podijeljen s brojem cigareta u kutiji (20). BMI – indeks tjelesne mase, izračunat kao kvocijent težine (kg) i visine (m) na kvadrat. Statistički značajna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Podebljane su statistički značajne razlike usporedbom GOLD skupina.

[a] Statistički značajna razlika usporedbom GOLD II i GOLD III s GOLD IV.

[b] Statistički značajna razlika usporedbom sve tri GOLD skupine.

[c] Statistički značajna razlika usporedbom GOLD III i GOLD IV.

4.2 Koncentracije općih biljega sistemske upale

U skupini zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om određeni su opći pokazatelji sistemske upalne reakcije. Rezultati su prikazani u Tablici 7. Koncentracije CRP-a, fibrinogena te ukupni broj leukocita i udio neutrofilnih granulocita bili su statistički značajno viši kod bolesnika s KOPB-om ($P \leq 0,001$). Koncentracije CRP-a u obje ispitane skupine, te ukupni broj leukocita u bolesnika s KOPB-om, bili su viši od referentnih vrijednosti, ukazujući na prisutnost upale niskog stupnja u obje ispitane skupine. Udio limfocita bio je viši u zdravih ispitanika ($P < 0,001$). Nije nađena razlika u udjelu monocita.

Tablica 7. Biljezi sistemske upale kod zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om

	zdravi ispitanici (N=45)	**bolesnici s KOPB-om (N=106)**	**P**
CRP (mg/L)	7,7 (2,9 – 9,8)	13,5 (8,4 – 46,2)	**< 0,001**
fibrinogen (g/L)	2,2 (1,8 – 2,6)	2,5 (2,1 – 3,3)	**0,001**
ukupni leukociti ($x10^9$/L)	7,0 ± 1,8	10,7 ± 4,4	**< 0,001**
neutrofilni granulociti (%)	56 ± 6	72 ± 13	**< 0,001**
monociti (%)	7 ± 1	7 ± 3	0,184
limfociti (%)	34 ± 7	20 ± 13	**< 0,001**

Kvantitativni podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) i aritmetička sredina ± standardna devijacija. CRP – C-reaktivni protein. Statistički značajna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti $P < 0,05$. Podebljane su statistički značajne razlike u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Biljezi sistemske upale u pojedinim skupinama bolesnika s KOPB-om podijeljenim prema težini bolesti prikazani su u Tablici 8. Nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama pokazatelja sistemske upale usporedbom skupina bolesnika s umjerenim, teškim i vrlo teškim KOPB-om (145).

Tablica 8. Biljezi sistemske upale u bolesnika s KOPB-om ovisno o težini bolesti

	GOLD II (N=28)	**GOLD III (N=49)**	**GOLD IV (N=29)**	**P**
CRP (mg/L)	12,8 (8,1 – 28,1)	12,9 (8,0 – 63,7)	15,9 (10,2 – 39,2)	0,714
fibrinogen (g/L)	2,5 (2,2 – 3,3)	2,6 (2,0 – 3,8)	2,4 (2,2 – 2,7)	0,317
ukupni leukociti ($x10^9$/L)	9,3 (7,6 – 10,8)	9,9 (7,9 – 12,8)	11,7 (8,0 – 13,7)	0,155
neutrofilni granulociti (%)	70 (63 – 79)	73 (62 –79)	79 (70 – 85)	0,162
monociti (%)	7 (6 – 10)	7 (5 – 8)	7 (5 – 8)	0,359
limfociti (%)	20 (14 – 27)	18 (14 – 28)	14 (10 – 25)	0,130

Podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). CRP – C-reaktivni protein. Statistički značajna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05.

4.3 Koncentracije biljega sistemskog oksidacijskog stresa

Kao biljezi oksidacijskog stresa kod zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om ispitane su koncentracije pokazatelja s antioksidacijskim djelovanjem (ceruloplazmin, ukupni bilirubin, albumin, transferin, slobodne tiolne skupine i PON1) te pokazatelja lipidne peroksidacije (MDA).

Koncentracije ukupnog bilirubina nisu se razlikovale usporedbom zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om (Tablica 9). Nasuprot tome, koncentracije ceruloplazmina su bile više ($P < 0,001$), dok su one albumina, transferina i slobodnih tiolnih skupina bile niže u bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($P < 0,001$). Koncentracije MDA bile su statistički značajno više u bolesnika s KOPB-om, a najviše vrijednosti MDA zabilježene su u bolesnika s vrlo teškim oblikom KOPB-a ($P = 0,004$) (Tablica 10). Paraoksonazna katalitička aktivnost PON1, te njena arilesterazna aktivnost, bile su statistički značajno niže u bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Obzirom da se PON1 uglavnom nalazi vezana za HDL, njene su paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti standardizirane na koncentraciju HDL-a u obje ispitivane skupine. Obje ispitane standardizirane aktivnosti PON1 bile niže u bolesnika s KOPB-om (Tablica 9).

Tablica 9. Biljezi sistemskog oksidacijskog stresa u zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om

	zdravi ispitanici (N=45)	**bolesnici s KOPB-om (N=106)**	**P**
ceruloplazmin (g/L)	0,439 ± 0,120	0,599± 0,266	**< 0,001**
ukupni bilirubin (µmol/L)	7,1 (5,5 – 10,9)	6,4 (5,2 – 8,3)	0,102
albumin (g/L)	49,2 ± 6,9	39,3 ± 5,8	**< 0,001**
transferin (g/L)	2,92 ± 0,77	2,29 ± 0,56	**< 0.001**
slobodni tioli (mmol/L)	0,159 ± 0,051	0,086 ± 0,047	**< 0,001**
MDA (mmol/L)	9,622 ± 4,628	13,194 ± 8,320	**0,008**
POX (U/L)	168 (132 - 316)	135 (86 - 267)	**0,008**
POX/HDL (U/mmol)	110 (91 - 220)	92 (61 - 190)	**0,007**
ARE (kU/L)	43 (30 - 53)	20 (14 - 27)	**< 0,001**
ARE/HDL (kU/mmol)	28 (19 - 34)	14 (10 - 19)	**< 0,001**

Kvantitativni podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon) i aritmetička sredina ± standardna devijacija. MDA – malondialdehid. POX – paraoksonazna aktivnost paraoksonaze (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1. Statistički značajna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Podebljane su statistički značajne razlike u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Usporedbom skupina bolesnika s KOPB-om podijeljenih prema težini bolesti nije nađena razlika u koncentracijama sistemskih antioksidacijskih pokazatelja (Tablica 10) (143,145).

Tablica 10. Biljezi sistemskog oksidacijskog stresa u bolesnika s KOPB-om ovisno o težini bolesti

	GOLD II (N=28)	**GOLD III (N=49)**	**GOLD IV (N=29)**	**P**
ceruloplazmin (g/L)	0,538 (0,375 – 0,647)	0,537 (0,439 – 0,741)	0,530 (0,413 – 0,791)	0,281
ukupni bilirubin (μmol/L)	6,9 (5,2 – 8,5)	6,7 (5,4 – 8,4)	6,2 (5,0 – 8,0)	0,662
albumin (g/L)	39,7 (35,4 – 43,4)	40,3 (36,3 – 43,3)	39,7 (33,9 – 43,3)	0,640
transferin (g/L)	2,21 (1,99 – 2,41)	2,27 (2,06 – 2,66)	2,23 (1,77 – 2,65)	0,070
slobodni tioli (mmol/L)	0,080 (0,058 – 0,116)	0,081 (0,050 – 0,123)	0,081 (0,046 – 0,101)	0,799
MDA (mmol/L)	8,800 (6,600 – 12,800)	10,700 (7,150 – 16,750)	14,900 (11,025 – 19,375)	**0,004**
POX (U/L)	114 (82 - 219)	145 (77 - 308)	144 (107 - 265)	0,399
POX/HDL (U/mmol)	85 (62 - 153)	105 (59 - 202)	93 (71 - 202)	0,679
ARE (kU/L)	20 (14 - 27)	23 (15 - 28)	17 (13 - 25)	0,519
ARE/HDL (kU/mmol)	15 (11 - 21)	14 (10 - 19)	15 (8 - 18)	0,455

Kvantitativni podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). MDA – malondialdehid. POX – paraoksonazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1. Statistički značajna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Podebljana je statistički značajna razlikanađena usporedbom GOLD II i GOLD III s GOLD IV.

4.4 Utjecaj pušenja i KOPB-a na biljege sistemskog oksidacijskog stresa i upale

Utjecaj pušenja na pokazatelje oksidacijskog stresa i upale ispitan je tako da su zdravi ispitanici i bolesnici s KOPB-om podijeljeni ovisno o navikama pušenja u tri skupine: pušači, bivši pušači i nepušači. Rezultati su prikazani u Tablici 11.

Koncentracije ceruloplazmina, ukupnog bilirubina, albumina, transferina, tiola i MDA nisu se razlikovale usporedbom zdravih ispitanika podijeljenih prema pušačkim navikama.

Nasuprot tome, naši rezultati ukazuju da pušenje utječe na aktivnosti PON1 kod zdravih ispitanika. Paraoksonazna aktivnost PON1 i njen omjer s HDL-om bile su statistički značajno niže kod zdravih pušača i bivših pušača u usporedbi sa zdravim nepušačima. Najviše arilesterazne aktivnosti PON1 i njenog omjera s HDL-om zabilježene su kod zdravih bivših pušača u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima.

Usporedbom pušača, bivših pušača i nepušača iz skupine bolesnika s KOPB-om nisu nađene razlike u koncentracijama promatranih pokazatelja oksidacijskog stresa i upale (143,145).

Tablica 11. Biljezi oksidacijskog stresa u ispitivanim podskupinama prema pušenju

zdravi ispitanici	pušači (N=16)	bivši pušači (N=13)	nepušači (N=16)	P
ceruloplazmin (g/L)	0,431 (0,344 – 0,537)	0,399 (0,307 – 0,461)	0,505 (0,367 – 0,558)	0,143
ukupni bilirubin (µmol/L)	6,8 (5,3 – 8,2)	7,1 (5,4 – 11,0)	8,8 (6,2 – 12,7)	0,177
albumin (g/L)	46,6 (44,6 – 54,7)	50,1 (45,8 – 56,7)	46,7 (42,0 – 50,9)	0,216
transferin (g/L)	2,63 (2,33 – 3,32)	2,70 (2,48 – 3,35)	2,71 (2,62 – 3,08)	0,938
slobodni tioli (mmol/L)	0,153 (0,091 – 0,181)	0,179 (0,169 – 0,203)	0,152 (0,115 – 0,192)	0,087
MDA (mmol/L)	8,350 (6,550 – 10,150)	10,500 (7,700 – 14,800)	8,150 (6,450 – 10,950)	0,380
POX (U/L)	131 (112 - 171)	164 (144 - 325)	251 (172 – 416)	**0,003**[a]
POX/HDL (U/mmol)	90 (80 - 118)	137 (99 - 251)	167 (106 - 322)	**0,005**[a]
ARE (kU/L)	31 (24 - 46)	53 (41 - 56)	39 (29 - 53)	**0,007**[b]
ARE/HDL (kU/mmol)	20 (17 - 29)	33 (27 - 51)	28 (21 - 34)	**0,005**[b]
bolesnici s KOPB-om	**pušači (N = 32)**	**bivši pušači (N = 27)**	**nepušači (N = 47)**	**P**
ceruloplazmin (g/L)	0,523 (0,399 – 0,692)	0,604 (0,388 – 0,824)	0,528 (0,456 – 0,691)	0,539
ukupni bilirubin (µmol/L)	6,3 (5,3 – 7,6)	7,8 (5,4 – 9,2)	6,3 (4,7 – 8,3)	0,342
albumin (g/L)	40,0 (35,9 – 43,9)	40,3 (35,2 – 43,8)	38,9 (34,5 – 42,7)	0,461
transferin (g/L)	2,23 (1,88 – 2,49)	2,27 (1,98 – 2,80)	2,26 (2,04 – 2,57)	0,438
slobodni tioli (mmol/L)	0,082 (0,047 – 0,116)	0,099 (0,055 – 0,127)	0,069 (0,050 – 0,099)	0,063
MDA (mmol/L)	11,700 (7,550 – 18,000)	12,700 (9,150 – 16,250)	10,200 (7,375 – 15,300)	0,515
POX (U/L)	131 (89 - 198)	115 (67 - 267)	140 (96 - 308)	0,684
POX/HDL (U/mmol)	75 (61 - 132)	108 (50 - 186)	110 (64 - 205)	0,567
ARE (kU/L)	22 (15 - 25)	16 (11 - 27)	20 (15 - 28)	0,592
ARE/HDL (kU/mmol)	13 (1 - 19)	12 (7 - 20)	15 (12 - 19)	0,615

Kvantitativni podaci su prikazani kao medijan (interkvartilni raspon). MDA – malondialdehid. POX – paraoksonazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1. Statistički značajna razlika utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Podebljane su statistički značajne razlike usporedbom skupina podijeljenih prema pušačkim navikama.

[a]*Statistički značajna razlika usporedbom pušača i bivših pušača s nepušačima.*

[b] *Statistički značajna razlika usporedbom bivših pušača s nepušačima i pušačima.*

4.5 Povezanost biljega sistemskog oksidacijskog stresa s poremećajem plućne funkcije

Rezultati povezanosti ispitanih pokazatelja sistemskog oksidacijskog stresa određenih iz uzoraka periferne krvi s mjerama koje definiraju funkciju pluća u KOPB-u (FEV_1 i FEV_1/FVC) prikazani su u Tablici 12.

Povezanost je izražena koeficijentom korelacije (r). Jedini pokazatelj koji statistički značajno korelira s FEV_1 je MDA (P = 0,002). Obzirom da dobiveni koeficijent korelacije ukazuje na slabu povezanost MDA s FEV_1 (r = - 0,29), općenito se može zaključiti da nije nađena povezanost pokazatelja sistemskog oksidacijskog stresa i parametara koji definiraju plućnu funkciju kod bolesnika s KOPB-om.

Tablica 12. Povezanost ispitivanih pokazatelja sistemskog oksidacijskog stresa s parametrima plućne funkcije u bolesnika s KOPB-om

	FEV_1		**FEV_1/FVC**	
	r	**P**	**r**	**P**
ceruloplazmin (g/L)	- 0,06	0,558	0,14	0,144
ukupni bilirubin (µmol/L)	0,06	0,542	0,09	0,381
albumin (g/L)	- 0,02	0,825	- 0,08	0,406
transferin (g/L)	0,03	0,752	0,03	0,728
MDA (mmol/L)	**- 0,29**	**0,002**	- 0,07	0,420
slobodni tioli (mmol/L)	- 0,05	0,633	0,04	0,643
POX (U/L)	0,12	0,224	0,07	0,483
ARE (kU/L)	0,11	0,255	0,01	0,897

r – koeficijent korelacije. MDA – malondialdehid. POX –paraoksonazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1.Statistička značajnost utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Podebljani su statistički značajni koeficijenti korelacije.

4.6 Povezanost antioksidacijskih biljega sa sistemskom upalom i oksidacijskim stresom

Iako ceruloplazmin, albumin i transferin imaju antioksidacijska svojstva, oni se prvenstveno smatraju proteinima akutne faze. Koncentracije ceruloplazmina rastu, dok one albumina i transferina padaju u poremećajima popraćenim sistemskom upalnom reakcijom.

Rezultati dobiveni ispitivanjem povezanosti navedenih pokazatelja s pokazateljima sistemske upale (CRP, fibrinogen) i sistemskog oksidacijskog stresa (slobodni tioli, MDA, PON1) u bolesnika s KOPB-om prikazani su u Tablici 13. Povezanost je izražena koeficijentom korelacije. Ceruloplazmin pokazuje dobru pozitivnu korelaciju s CRP-om ($P < 0,001$), te slabu pozitivnu korelaciju s fibrinogenom ($P < 0,001$). Albumin i transferin pokazuju slabu negativnu korelaciju s CRP-om ($P < 0,001$), te slabu pozitivnu korelaciju sa slobodnim tiolima. Transferin pokazuje slabu negativnu korelaciju s fibrinogenom ($P = 0,018$). Nije nađena statistički značajna korelacija između ceruloplazmina, albumina te transferina i MDA u skupini bolesnika s KOPB-om. Korelacija PON1 aktivnosti s albuminom je statistički značajna, ali slaba (145).

Tablica 13. Povezanost ceruloplazmina, albumina i transferina s pokazateljima sistemske upale i sistemskog oksidacijskog stresa u bolesnika s KOPB-om

	ceruloplazmin (g/L)		**albumin (g/L)**		**transferin (g/L)**	
	r	**P**	**r**	**P**	**r**	**P**
CRP (mg/L)	**0,60**	**< 0,001**	**- 0,40**	**< 0,001**	**- 0,47**	**< 0,001**
fibrinogen (g/L)	**0,47**	**< 0,001**	**-** 0,06	0,541	**- 0,24**	**0,018**
slobodni tioli (mmol/L)	0,14	0,159	**0,34**	**< 0,001**	**0,27**	**0,005**
MDA (mmol/L)	0,14	0,151	**0,21**	**0,030**	0,08	0,423
POX (U/L)	0,01	0,886	**0,23**	**0,016**	0,05	0,584
ARE (kU/L)	0,09	0,346	**0,39**	**< 0,001**	**0,29**	**0,002**

r – koeficijent korelacije. MDA – malondialdehid. POX –paraoksonazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1. Statistička značajnost utvrđena je temeljem vrijednosti $P < 0,05$. Podebljani su statistički značajni koeficijenti korelacije.

Nije nađena statistički značajna korelacija ceruloplazmina, albumina i transferina s biljezima sistemskog oksidacijskog stresa i upale kod zdravih ispitanika (Tablica 14).

Tablica 14. Povezanost ceruloplazmina, albumina i transferina s pokazateljima sistemske upale i sistemskog oksidacijskog stresa kod zdravih ispitanika

	ceruloplazmin (g/L)		**albumin (g/L)**		**transferin (g/L)**	
	r	**P**	**r**	**P**	**r**	**P**
CRP (mg/L)	0,08	0,616	0,07	0,634	0,05	0,764
fibrinogen (g/L)	0,24	0,110	0,06	0,702	0,07	0,646
slobodni tioli	0,13	0,390	0,24	0,111	0,16	0,280
MDA (mmol/L)	0,21	0,171	0,09	0,577	0,18	0,248
POX (U/L)	0,19	0,224	0,05	0,745	0,06	0,694
ARE (kU/L)	0,16	0,296	0,25	0,098	0,26	0,085

r – koeficijent korelacije. MDA – malondialdehid. POX – paraoksonazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1. Statistička značajnost utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05.

4.7 Diskriminacijske sposobnosti biljega sistemskog oksidacijskog stresa

Diskriminacijske sposobnosti biljega sistemskog oksidacijskog stresa u razlikovanju zdravih i oboljelih od KOPB-a prikazane su u Tablici 15. One su opisane koristeći specifičnost i osjetljivost biljega kod određene granične vrijednosti, te AUC. Dijagnostička osjetljivost je sposobnost pretrage da osobe s bolešću (u našem slučaju KOPB-om) razvrsta kao pozitivne, dok je dijagnostička specifičnost sposobnost pretrage da zdrave osobe razvrsta kao negativne. Analiza ROC krivulje može poslužiti za odabir optimalne granične vrijednosti, odnosno one kod koje će udio lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata biti najmanji. Optimalna kombinacija osjetljivosti i specifičnosti na ROC krivulji za pojedini biljeg obilježena je točkom koja je najbliža gornjem lijevom kutu krivulje, a određena je najvećim AUC-om. To znači da veće vrijendosti AUC-a označavaju bolje diskriminacijske sposobnosti biljega.

Ceruloplazmin i MDA pokazuju umjerene sposobnosti razlikovanja zdravih i oboljelih od KOPB-a. Transferin i paraoksonazna aktivnost PON1 se mogu smatrati dobrim dijagnostičkim pokazateljima, dok su albumin, slobodni tioli i arilesterazna aktivnost PON1 vrlo dobri pokazatelji za diskriminaciju zdravih ispitanika od bolesnika s KOPB-om (143,145).

Tablica 15. Dijagnostička točnost ispitivanih biljega oksidacijskog stresa

	AUC (95% CI)	**osjetljivost (95% CI)**	**specifičnost (95% CI)**	**granična vrijednost**	**P**
ceruloplazmin (g/L)	0,68 (0,60 – 0,75)	52,8 (42,9 – 62,6)	73,3 (58,1 – 85,4)	> 0,519	**0,001**
albumin (g/L)	0,87 (0,80 – 0,92)	74,5 (65,1 – 82,5)	86,1 (72,1 – 94,7)	≤ 43,1	**< 0,001**
transferin (g/L)	0,78 (0,70 – 0,84)	72,6 (63,1 – 80,9)	77,8 (62,9 – 88,8)	< 2,46	**< 0,001**
slobodni tioli (mmol/L)	0,86 (0,79 – 0,91)	71,7 (62,1 – 80,0)	88,9 (75,9 – 96,3)	< 0,103	**< 0,001**
MDA (mmol/L)	0,63 (0,55 – 0,71)	53,3 (43,4 – 63,0)	73,3 (58,1 – 85,4)	> 10,900	**0,005**
POX (U/L)	0,71 (0,59 – 0,81)	57,1 (37,2 - 75,5)	86,7 (73,2 - 94,9)	≤ 116	**0,002**
ARE (kU/L)	0,83 (0,73 – 0,91)	78,6 (59,0 - 91,7)	80,0 (65,4 - 90,4)	≤ 28	**< 0,001**

AUC – površina ispod krivulje. 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti. MDA – malondialdehid. POX – paraoksonazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1. Statistička značajnost utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Podebljani su statistički značajni biljezi dijagnostičke točnosti.

4.8 Modeli za predviđanje prisutnosti bolesti

Koristeći logističku regresijsku analizu ispitali smo povezanost pokazatelja oksidacijskog stresa i prisutnosti bolesti, odnosno sposobnost kombinacije pojedinačnih biljega oksidacijskog stresa (različitih modela) da predvide prisutnost bolesti.

Koncentracije ukupnog bilirubina nisu uključene u ovu analizu obzirom da nije nađena razlika usporedbom skupine zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om.

Prvi korak u logističkoj regresiji je univarijatna analiza i izračun pripadajućeg omjera izgleda. U univarijatnu logističku regresiju uključeni su svi ispitani parametri oksidacijskog stresa. Univarijatna analiza je identificirala ceruloplazmin, albumin, transferin, slobodne tiole, MDA te paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost PON1 kao statistički značajne prediktore za izradu modela za predviđanje bolesti. Rezultati ukazuju da je ceruloplazmin najbolji pojedinačni prediktor KOPB-a uz OR = 42,86 ($P < 0,001$). To znači da su bolesnici s povišenim koncentracijama ceruloplazmina imali povećan omjer izgleda za prisutnost bolesti. Pojedinačni prediktori povećanog rizika za prisutnost bolesti su i koncentracija MDA te paraoksonazna aktivnost PON1 (OR $\geq$1). Ostali ispitivani pokazatelji (albumin, transferin, slobodni tioli, arilesterazna aktivnost PON1) imaju OR < 1. To znači da njihove povećane koncentracije djeluju protekcijski, odnosno smanjuju izglede za prisutnost KOPB-a (Tablica 16).

Obzirom da su svi pokazatelji oksidacijskog stresa nakon univarijatne analize bili statistički značajni, svi su uključeni u multivarijatnu analizu. Kao statistički značajni prediktori KOPB-a u konačnom modelu preostali su ceruloplazmin, albumin, MDA i arilesterazna aktivnost PON1 (Tablica 16). Multivarijatni model koji uključuje ceruloplazmin, albumin, MDA i arilesteraznu aktivnost PON1 postigao je AUC (95% CI) = 0,96 (0,92 – 0,99). Koeficijent determinacije za taj model iznosio je 0,89. To znači da bi se u 89% bolesnika s KOPB-om uporabom ovog modela mogla ispravno predvidjeti prisutnost bolesti.

Obzirom na razlike u dobi, BMI-u i raspodjeli po spolovima između zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om, uzet je u obzir i njihov mogući utjecajna predloženi multiparametrijski model, stoga su i one u sljedećem koraku uključene u multivarijatnu analizu. Model koji uključuje ceruloplazmin, albumin, MDA i arilesteraznu aktivnost PON1, prilagođen prema spolu, dobi i BMI-u, pokazao je AUC (95% CI) = 0,99 (0,96 – 1,00), a koeficijent

determinacije se povećao na 0,95, što znači da je udio ispravno klasificiranih slučajeva KOPB-a porastao na 95%.

Naposljetku, u prilagođeni multiparametrijski model uključeni su i pokazatelji sistemske upale. Konačni model koji je sadržavao vrijednosti ceruloplazmina, albumina, MDA i arilesteraznu aktivnost PON1, zatim CRP-a, fibrinogena i ukupnih leukocita, te kovarijable spol, dob i BMI, rezultirao je s AUC (95% CI) = 0,99 (0,97 – 1,00) i udjelom ispravno klasificiranih bolesnika od 97% (143,145).

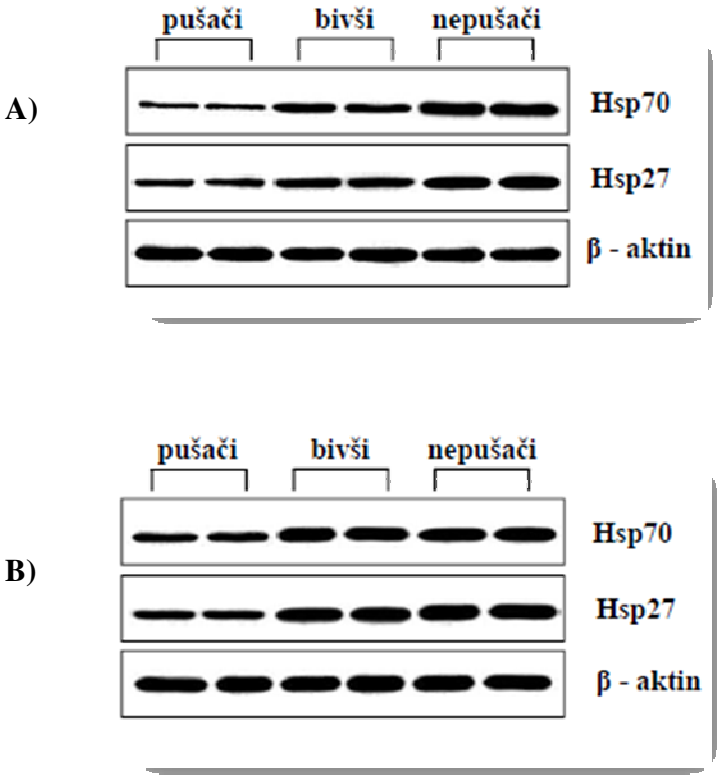
Tablica 16. Univariatna i multivarijatna logistička regresija: sposobnost predviđanja KOPB-a koristeći biljege sistemskog oksidacijskog stresa

	univarijatna regresijska analiza		**multivarijatna regresijska analiza**	
	OR (95% CI)	**P**	**OR (95% CI)**	**P**
ceruloplazmin (g/L)	42,86 (4,79 – 383,52)	< 0,001	89,16 (2,54 – 3132,17)	0,005
albumin (g/L)	0,76 (0,69 – 0,84)	< 0,001	0,73 (0,64 – 0,84)	< 0,001
transferin (g/L)	0,22 (0,11 – 0,44)	< 0,001	-	-
slobodni tioli (mmol/L)	0,00 (0,00 – 0, 00)	< 0,001	-	-
MDA (mmol/L)	1,09 (1,02 – 1,16)	0,004	1,13 (1,02 – 1,27)	0,026
POX (U/L)	1,00 (1,00 – 1,00)	0,028	-	-
ARE (kU/L)	0,89 (0,86 – 0,93)	< 0,001	0,89 (0,86 – 0,93)	< 0,001

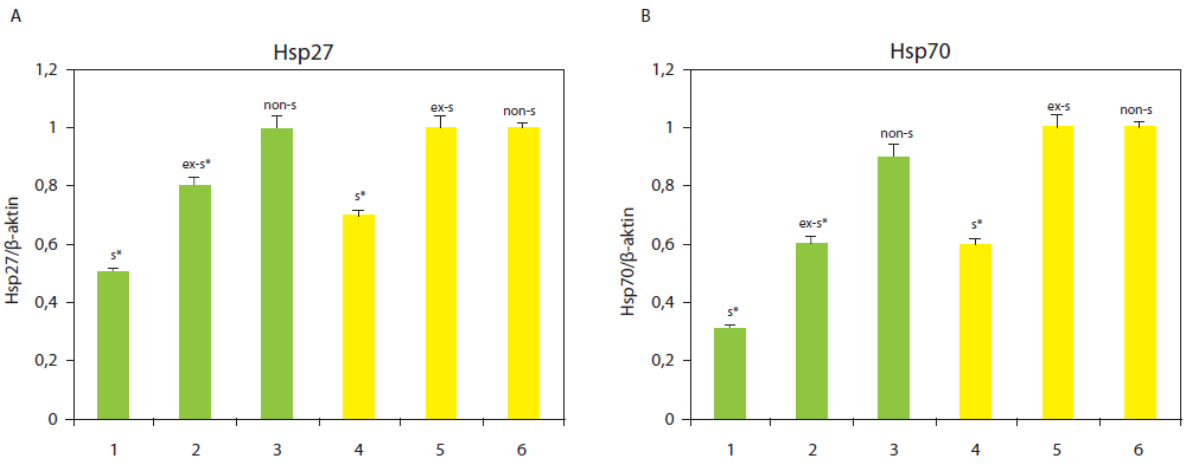
OR – omjer izgleda. 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti. MDA – malondialdehid. POX – paraoksonazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). ARE – arilesterazna aktivnost PON1. Statistička značajnost utvrđena je temeljem vrijednosti P < 0,05. Prikazani su samo statistički značajni prediktori bolesti.

4.9 Promjene u ekspresiji proteina toplinskog šoka

Povećanje ekspresije Hsp-ova štiti stanicu od različitih stresova. Razina ekspresije Hsp27 i Hsp70 određena je u leukocitima periferne krvi zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om (Slika 8 i 9). Ekspresija oba ispitivana proteina toplinskog šoka bila je statistički značajno niža u pušača s KOPB-om, bivših pušača s KOPB-om i zdravih pušača u usporedbi sa zdravim nepušačima. Najizraženija supresija ekspresije Hsp70 i Hsp27 primijećena je u pušača s KOPB-om (146).



Slika 8. Ekspresija Hsp27 i Hsp70 u leukocitima periferne krvi bolesnika s KOPB-om (A) izdravih ispitanika (B). *Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije Hsp27, Hsp70 i β-aktina iz tri neovisna eksperimenta.*

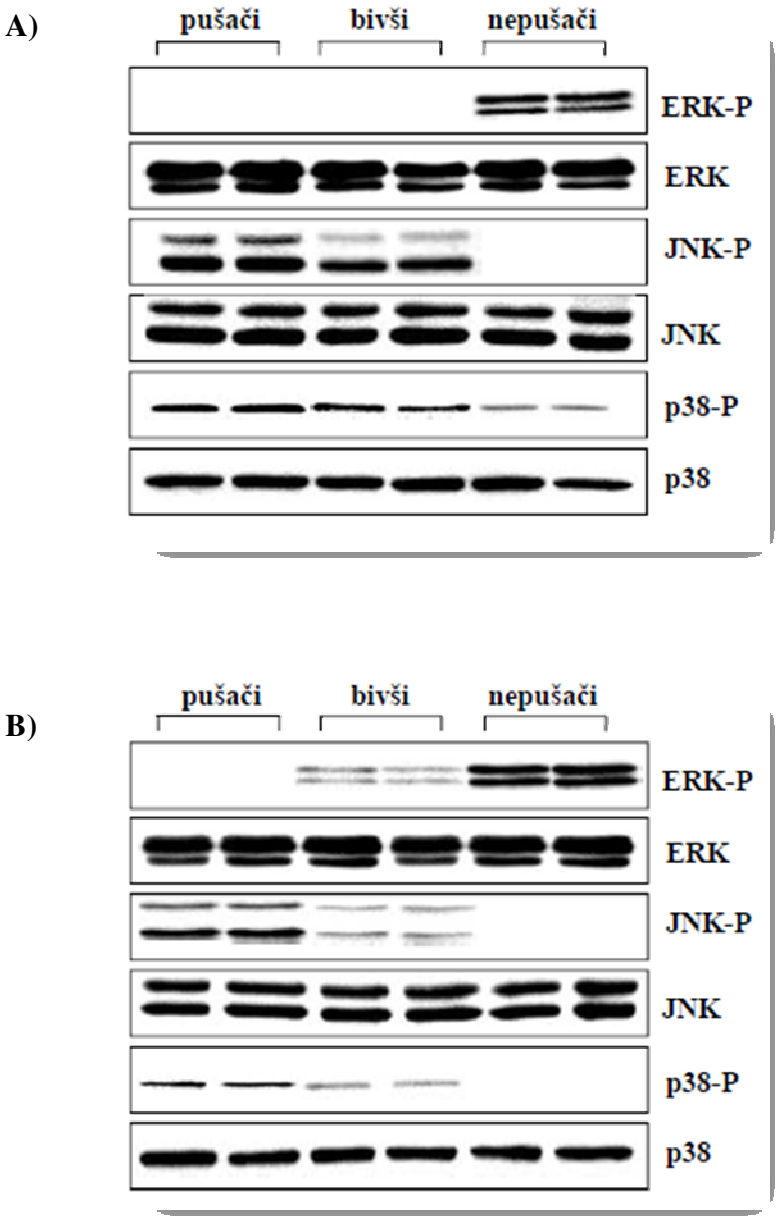


Slika 9. Grafički prikaz razine ekspresije Hsp27 (A) i Hsp70 (B) u bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika.

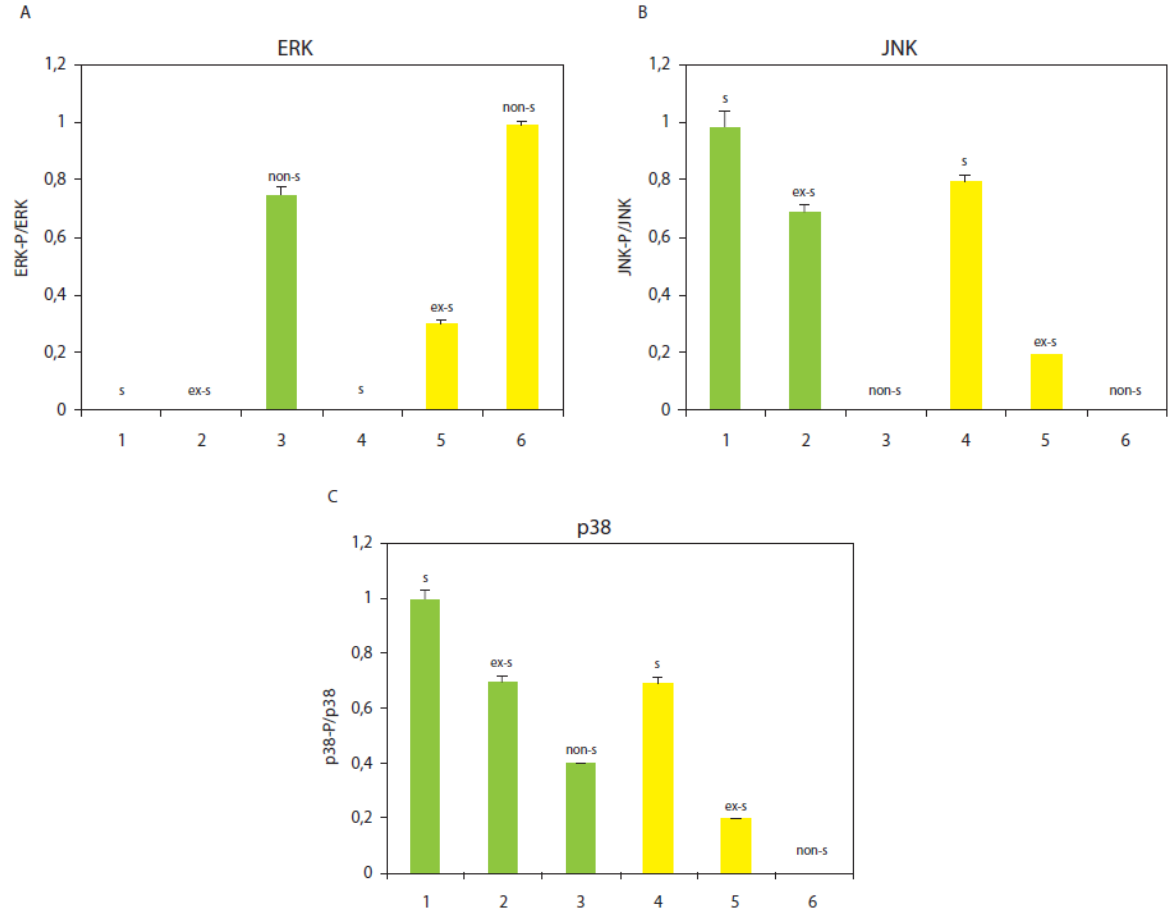
Stupci označeni 1, 2, 3 (zeleno) prikazuju ekspresiju Hsp-ova u bolesnika s KOPB-om, dok stupci 4, 5, 6 prikazuju ekspresiju u zdravih ispitanika (žuto). Stupci 1 i 4 predstavljaju pušače (s), stupci 2 i 5 bivše pušače (ex-s), te stupci 3 i 6 nepušače (non-s). Prikazani podaci dobiveni su denzitometrijskom analizom vrpci iz tri neovisna eksperimenta, a ekspresija Hsp27 prikazana je u odnosu na ekspresiju proteina β-aktina zdravih nepušača. Statistički značajna razlika u ekspresiji utvrđena je usporedbom s ekspresijom Hsp27/Hsp70 u zdravih nepušača, a temeljem vrijednosti P < 0,05. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (*).

4.10 Promjene u aktivaciji MAPK

Aktivacija i ekspresija MAPK prikazana je na Slikama 10 i 11. Ekspresija svih ispitivanih MAPK (ERK, JNK i p38) u perifernim leukocitima bolesnika s KOPB-om nije promijenjena u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Nasuprot tome, aktivacija (fosforilacija) MAPK je ovisila o pušenju i prisutnosti bolesti. Fosforilacija ERK bila je značajnija kod zdravih i bolesnih nepušača. Slaba aktivacija ERK primijećena je i kod zdravih bivših pušača. Fosforilacija JNK i p38 bila je izražena u bivših pušača s KOPB-om i zdravih pušača. Najizraženija aktivacija JNK i p38 MAPK zabilježena je u pušača s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima (P < 0,05). Blaga aktivacija p38 zabilježena je i u nepušača s KOPB-om (147).



Slika 10. Aktivacija MAPK u leukocitima periferne krvi bolesnika s KOPB-om (A) i zdravih ispitanika (B). *Prikazani su reprezentativni imunoblotovi ekspresije i aktivacije MAPK iz tri neovisna eksperimenta.*



Slika 11. Grafički prikaz aktivacije MAPK u bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika. (A) ERK MAPK; (B) JNK MAPK; (C) p38 MAPK.

Stupci označeni 1, 2, 3 prikazuju aktivaciju MAPK u bolesnika s KOPB-om (zeleno), dok stupci 4, 5, 6 prikazuju aktivaciju u zdravih ispitanika (žuto). Stupci 1 i 4 predstavljaju pušače (s), stupci 2 i 5 bivše pušače (ex-s), te stupci 3 i 6 nepušače (non-s). Prikazani podaci dobiveni su denzitometrijskom analizom vrpci iz tri neovisna eksperimenta. Aktivacija ERK prikazana je kao omjer aktivacije i ekspresije ERK u odnosu na zdrave pušače. Aktivacija JNK prikazana je kao omjer aktivacije i ekspresije JNK (u odnosu na bolesne pušače). Aktivacija p38 prikazana je kao omjer aktivacije i ekspresije (p38 u odnosu na bolesne pušače).

5 RASPRAVA

Kronična opstrukcijska plućna bolest predstavlja važan problem u javnozdravstvenom smislu zbog stalno rastuće globalne prevalencije i pobola. Uzrokuje važne ekonomske posljedice u sustavu zdravstva, ali utječe i na radnu sposobnost i na kvalitetu života bolesnika.

Unatoč značajnom napretku u razumijevanju mehanizama koji dovode do nastanka KOPB-a u posljednjih desetak godina, patofiziološki mehanizmi bolesti nisu još sasvim jasni. Bolje razumijevanje patogenetskih mehanizama uključenih u razvoj sistemskih učinaka KOPB-a može doprinijeti boljem razumijevanju bolesti i omogućiti razvoj novih terapijskih mogućnosti.

Tradicionalno shvaćanje KOPB-a podrazumijeva bolest pluća obilježenu ireverzibilnim ograničenjem protoka zraka i kroničnom upalom malih dišnih putova i parenhima pluća. Upalni odgovor u plućima bolesnika s KOPB-om obilježen je povećanim brojem makrofaga, neutrofila i limfocita T, povećanim koncentracijama upalnih citokina, te prisutnošću oksidacijskog stresa. Međutim, suvremene spoznaje o KOPB-u proširuju tradicionalno poimanje bolesti. Kronična opstrukcijska plućna bolest se danas smatra kompleksnom i heterogenom sistemskom bolešću.

Ovaj rad predstavlja rezultate ispitivanja sistemskih biljega oksidacijskog stresa (albumina, transferina, ceruloplazmina, ukupnog bilirubina, slobodnih tiolnih skupina, MDA, PON1, te ekspresije i aktivacije unutarstaničnih signalnih molekula Hsp70, Hsp27, ERK, JNK i p38) u bolesnika sa stabilnom KOPB i njihove povezanosti s biljezima sistemske upale (CRP, fibrinogen, ukupni leukociti) i funkcijom pluća (FEV_1 i FEV_1/FVC).

Ukupni leukociti u krvi bolesnika s KOPB-om su povećani u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Istraživanja su pokazala da su leukociti u bolesnika s KOPB-om povezani sa sistemskom upalom, učestalim egzacerbacijama i smrtnošću (148). Leukociti bolesnika sa stabilnom bolešću stvaraju više ROS-a i eksprimiraju više adhezijskih molekula i biljega aktivacije i degranulacije od leukocita nepušača i leukocita zdravih pušača. Taj se učinak produbljuje u egzacerbacijama bolesti i povezan je sa značajnim iscrpljivanjem antioksidacijskog kapaciteta plazme (72,77,149,150). Obzirom na značaj leukocita u patogenezi bolesti i njihovu promijenjenu funkciju u KOPB-u, u ovom smo radu istražili promjene u unutarstaničnoj signalizaciji u leukocitima bolesnika sa stabilnim oblikom bolesti.

Proteini toplinskog šoka su visoko očuvani proteini prisutni u svim stanicama u organizmu. Njihova šaperonska funkcija čini ih centralnim molekulama u kontroli kvalitete proteina u stanici. Djelovanjem stresnih podražaja na stanicu, uključujući upalu i oksidacijski stres, dolazi do promjene unutarstanične homeostaze proteina, pri čemu se nakupljaju oštećeni i nespecifično agregirani proteini. Upravo je taj unutarstanični događaj signal za aktivaciju staničnog odgovora na stres i pojačanu ekspresiju Hsp-ova.

Temeljna uloga Hsp-ova u oksidacijskom stresu je zaštita stanice. Oksidacijski stres, osim promjena na lipidima i DNA, uzrokuje nakupljanje oksidacijski promijenjenih nefunkcionalnih proteina. To je događaj koji potiče aktivaciju upalnih i apoptoznih signalnih putova u stanici, te sintezu Hsp-ova. Novosintetizirani Hsp-ovi djeluju šaperonski na denaturirane proteine potičući preživljenje stanice i osiguravajući prolaznu zaštitu od stresnih podražaja. Osim ovog neizravnog mehanizma, Hsp-ovi mogu spriječiti aktivaciju apoptoze izravnom inhibicijom aktivacije kaspaza na nekoliko razina apoptozne signalizacije i inhibicijom oslobađanja apoptoznih čimbenika iz mitohondrija (151,152). Dakle, proteini toplinskog šoka na oksidacijski stres djeluju na nekoliko razina (popravak i/ili uklanjanje oštećenih proteina, inhibicija apoptoze i protuupalni učinak) stoga se smatra da imaju ključnu ulogu u zaštiti stanice od upalnih i oksidacijskih poremećaja. Nekoliko je istraživanja povezalo Hsp-ove sa složenom patogenezom KOPB-a (153,154). Upravo su zato oni prepoznati kao nove potencijalne terapijske mete za KOPB vrijedne istraživanja (155,156).

Hsp70 štiti stanicu selektivno vezujući oksidacijski promijenjene proteine. Djeluje na ponovno smatanje oštećenih proteina, a ukoliko se oni ne mogu spasiti, potiče njihovo uklanjanje iz stanice. Obzirom da Hsp70 (zajedno s Hsp90) djeluje kao respresor HSF1, u oksidacijskom se stresu on oslobađa veze s HSF1 čime potiče ekspresiju i drugih *hsf* gena. Dakle, Hsp70 ima ulogu i u regulaciji stresnog odgovora. Osim toga, Hsp70 negativno regulira apoptozne putove izravnim vezanjem za članove apoptozne kaskade čime inhibira stvaranje apoptosoma i aktivaciju kaspaza.

Protein toplinskog šoka 27, slično Hsp70, štiti stanicu vežući nespecifično oksidacijski promijenjene proteine i sprječavajući njihovu agregaciju. Međutim, Hsp27 nakon izlaganja oksidacijskom stresu djeluje i antioksidacijski. Smanjuje bazalne koncentracije ROS-a u stanici održavajući GSH u reduciranom obliku, regulirajući oksidoredukcijsku homeostazu i izravno štiteći citoskelet (aktin) koji je vrlo osjetljiv na oksidacijsko oštećenje. Hsp27 djeluje

antiapoptozno inhibicijom oslobađanja citokroma c iz mitohondrija ili izravnim vezanjem na njega čime sprječava nastanak apoptosoma.

Aktivacija Hsp-ova (poglavito Hsp70) povećava toleranciju stanice na stresove koji mogu uslijediti te osigurava njenu zaštitu od drugih stresnih podražaja i nakon izlaganja oksidacijskom stresu. To znači da prethodno izlaganje stanice blažem (prolaznom) stresnom podražaju iz okoliša poboljšava njene izglede za zaštitu u nadolazećim stresnim situacijama. Na toj se činjenici temelji protuupalni učinak Hsp70. Oksidacijski stres aktivira upalne signalne putove u stanici aktivacijom transkripcijskog faktora NF-κB. Istraživanja pokazuju da se Hsp70 može vezati za NF-κB čime sprječava njegovo premještanje u jezgru i inhibira njegov upalni učinak (110-112).

Rezultati našeg ispitivanja ukazuju na smanjenu ekspresiju Hsp70 i Hsp27 u leukocitima periferne krvi pušača i bivših pušača s KOPB-om u usporedbi sa zdravim nepušačima. Smanjena ekspresija Hsp70 i Hsp27 primijećena je i u skupini zdravih pušača. Ekspresija oba promatrana Hsp-a bila je najizrazitije potisnuta u skupini pušača s KOPB-om. Naši su rezultati u skladu s rezultatima Zhao i sur. koji su pokazali da je ekspresija Hsp70 proteina i Hsp70 mRNA snižena u limfocitima bolesnika s KOPB-om u usporedbi s kontrolnom skupinom ispitanika. Ekspresija Hsp70 mRNA pozitivno je korelirala s ekpresijom Hsp70 proteina te su zaključili da je smanjena ekspresija Hsp70 u bolesnika s KOPB-om vjerojatno posljedica poremećaja u regulaciji transkripcije gena za Hsp70 (157). Cui i sur. su istraživali koncentracije Hsp70 i Hsp27 u limfocitima periferne krvi bolesnika s KOPB-om u skupini rudara koristeći imunoenzimski test (ELISA, engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) u kombinaciji s protočnom citometrijom. Suprotno našim rezultatima, oni su pokazali povećane unutarstanične koncentracije Hsp27 u limfocitima bolesnika s KOPB-om, dok usporedbom unutarstaničnih koncentracija Hsp70 između rudara s KOPB-om i zdravih ispitanika nije nađena razlika (153). Dobivene nepodudarnosti u rezultatima su vjerojatno posljedica različitog ustroja istraživanja, razlike u veličini ispitivanog uzorka i primijenjenim metodama za određivanje Hsp-ova.

Smanjena ekspresija Hsp70 i pogotovo Hsp27 vjerojatno doprinosi pogoršanju staničnog oksidacijskog stresa u KOPB-u. Naime, smatra se da Hsp27 djeluje citoprotekcijski u stanicama izloženim oksidacijskom stresu. Njegovo antioksidacijsko djelovanje temelji se na sposobnosti da umanjuje unutarstanične koncentracije ROS-a, a povećava koncentracije reduciranog oblika GSH unutar stanice. Čini se da Hsp27 izravno stimulira povećanje

aktivnosti glutation-reduktaze, glutation-S-transferaze i GPx, enzima koji sudjeluju u glutationskom ciklusu. Osim toga, pokazano je da Hsp27 snižava unutarstanične koncentracije željeza čineći ga nedostupnim u daljnim oksidacijskim reakcijama u kojima može doći do stvaranja hidroksilnog radikala (111,158,159).

Ključni korak u regulaciji ekspresije Hsp-ova je vezanje aktivnog HSF1 za HSE-ove u promotorskim regijama gena za Hsp-ove u jezgri. Pretpostavlja se da je smanjena ekspresija Hsp-ova u KOPB-u posljedica poremećaja u ekspresiji HSF1 ili njegova vezanja za HSE-ove (157). Stresni podražaji koji uzrokuju nakupljanje denaturiranih proteina utječu i na aktivaciju stresnih kinaza JNK i p38 MAPK. Povišene unutarstanične koncentracije Hsp70 čini se suprimiraju aktivaciju stresnih kinaza i time apoptoznu signalizaciju. Ipak, obzirom da su unutarstanične koncentracije Hsp70 snižene pod utjecajem različitih uzročnika stresa koji uzrokuje nakupljanje denaturiranih proteina, potiskivanje aktivacije stresnih kinaza može izostati (160,161). Naši rezultati potvrđuju snažnu aktivaciju JNK i p38 MAPK upravo u skupinama bolesnika kod kojih je ekspresija ispitivanih Hsp-ova bila smanjena (pušači i bivši pušači s KOPB-om te zdravi pušači) (146,147). Osim toga, pokazano je da se ERK i JNK mogu izravno vezati i fosforilirati HSF1 čime se može potisnuti njegova transkripcijska aktivnost (160).

Jedan od mogućih uzroka smanjene unutarstanične koncentracije ispitivanih Hsp-ova u bolesnika s KOPB-om mogao bi biti njihov pojačan prelazak u sistemski odjeljak. Mehanizmi kojima unutarstanični Hsp-ovi prelaze u sistemsku cirkulaciju vjerojatno podrazumijevaju aktivne mehanizme u fiziološkim uvjetima te pasivne mehanizme u slučaju nekroze stanica (162,163). Ispitivanja su pokazala povećane koncentracije izvanstaničnih Hsp-ova (uključujući Hsp27 i Hsp70) u bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima (155,164-166).

Aktivacija MAPK signalnih putova (uključujući ERK, JNK i p38) predstavlja još jedan evolucijski očuvani mehanizam odgovora stanice na stresni podražaj. Ovi signalni putovi reguliraju mehanizme uključene u preživljenje stanice, poput staničnog rasta, diferencijacije stanice, ali i apoptoze. Iako većina spoznaja o ekspresiji i aktivaciji unutarstaničnih signalnih molekula potječe iz istraživanja *in vitro* i eksperimentalnih modela, čini se da su MAPK signalni putovi uključeni u patogenetske mehanizme KOPB-a. Specifično, poremećaji unutarstaničnih MAPK signalnih putova mogli bi doprinijeti razvoju i održavanju neprimjerenog upalnog odgovora karakterističnog za KOPB.

Istraživanja *in vitro* pokazuju da izlaganje dimu cigareta uzrokuje vrlo brzu aktivaciju MAPK signalnih putova u epitelnim i endotelnim stanicama dišnih putova, te alveolarnim makrofagima (167,168). Ishod aktivacije MAPK može biti različit ovisno o vrsti stanice, štetnom podražaju i trajanju/dozi samog podražaja. Reaktivni kisikovi spojevi mogu aktivirati MAPK, a time i različite transkripcijske faktore, kao NF-κB i AP-1. Oni posljedično mogu inducirati sintezu medijatora upale, apoptozu i/ili proliferaciju stanice, ovisno o vrsti stanice i koncentraciji slobodnih radikala (167,169). Dok su ERK obično uključene u poticanje procesa stanične proliferacije, diferencijacije i preživljavanja stanice, nakon izlaganja oksidacijskom stresu, stresne kinaze (JNK i p38) imaju ključnu ulogu u sintezi citokina, upalnom odgovoru stanice te apoptozi. Učinak štetnog podražaja ovisi i o međudjelovanju različitih signalnih putova koji se aktiviraju u odgovoru na stresni podražaj (103).

Naši rezultati ukazuju da se ekspresije ERK, JNK i p38 MAPK u perifernim leukocitima bolesnika s KOPB-om ne razlikuju od ekspresija spomenutih MAPK u leukocitima zdravih ispitanika. Međutim, aktivacija ispitivanih MAPK pokazala je ovisnost o pušenju i prisutnosti bolesti. Aktivacija ERK je bila izražena u skupini nepušača, što je posebno bilo naglašeno u zdravih nepušača. Suprotno tome, najizraženija je aktivacija JNK i p38 primijećena u skupini pušača s KOPB-om, dok je nešto manje izražena aktivacija stresnih kinaza zabilježena kod bivših pušača s KOPB-om i zdravih pušača. Dakle, čini se da je u bolesnika s KOPB-om prisutan poremećaj dinamičke ravnoteže između ERK i stresnih kinaza (JNK i p38). Poremećaj u JNK i p38 MAPK signalnim putovima u leukocitima bolesnika s KOPB-om vjerojatno doprinosi razvoju i progresiji sistemske upale (147).

Iako su obje porodice stresnih kinaza povezane s upalnim mehanizmima i apoptozom, čini se da p38 ima istaknutiju ulogu u KOPB-u. Renda i sur. su istraživali ekspresiju i aktivaciju p38 MAPK u tkivu pluća i primarnim kulturama alveolarnih makrofaga u bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika s različitim pušačkim navikama. Pokazali su povećanu aktivaciju p38 MAPK u alveolarnim makrofagima i tkivu pluća u pušača oboljelih od KOPB-a u usporedbi sa zdravim ispitanicima, što je u skladu s našim rezultatima. Za razliku od naših rezultata, aktivacija p38 u opisanom istraživanju nije ovisila o pušačkom statusu (170). Povećana aktivacija p38 MAPK, ovisna o prisutnosti bolesti i pušenju, dokazana je i u ostalim specifičnim stanicama pluća (CD8 limfocitima, folikularnim B-stanicama, epitelnim stanicama bronha) (171,172). U ekperimentalnim modelima pokazano je da dim iz cigareta može aktivirati JNK i p38 MAPK signalne putove u različitim vrstama stanica (172-174). Liu i sur. su istraživali plućno tkivo tvorova nakon dugotrajne izloženosti dimu cigareta i pokazali

da je aktivacija JNK i p38 MAPK signalnih putova bila popraćena smanjenom aktivnošću MAPK fosfataze 1 (MKP-1, engl. *MAP kinase phosphatase-1*) (175). MAPK fosfataze su fosfataze dvojne specifičnosti koje svojim djelovanjem inaktiviraju MAPK defosforilacijom specifičnog treoninskog i tirozinskog ostatka u aktivacijskom središtu enzima. Djelovanjem ROS-a dolazi do oksidacije cisteina u aktivnom središtu fosfataze što dovodi do njene (reverzibilne ili ireverzibilne) inhibicije. Inhibicijom MAPK fosfazata potiče se (produžena) aktivacija JNK i p38 MAPK signalnih putova. Smatra se da je neprekidna aktivacija JNK podražaj koji ima ulogu u poticanju apoptoze (168,176,177). Aktivacija stresnih kinaza može biti potaknuta i smanjenom unutarstaničnom ekpresijom Hsp70 kod naših ispitanika s KOPB-om.

Stresne kinaze (JNK i p38 MAPK) predstavljaju pogodne molekularne mete za razvoj novih i učinkovitijih terapija u KOPB-u. Iako su daljnja istraživanja nužna, MAPK inhibitori su se pokazali učinkovitim agensima za smanjivanje upale, apoptoze, sinteze citokina, ublažavanje oštećenja tkiva i usporavanje progresije bolesti u KOPB-u (167,176,178,179).

Kronična opstrukcijska plućna bolest je s kliničkog, staničnog i molekularnog aspekta složena i multikomponentna bolest. Kako sistemski učinci značajno utječu na tijek i prognozu bolesti, jasno je da suvremeni pristup KOPB-u mora uključiti nove spoznaje o mehanizmima nastanka bolesti i implementirati ih u svakodnevnu kliničku praksu. Sveobuhvatni pristup bolesniku s KOPB-om, koji uključuje identifikaciju fenotipa bolesti i procjenu sistemskih učinaka na ukupno zdravstveno stanje bolesnika, vodi u individualizaciju procjene bolesti i optimizaciju terapijskog pristupa. Upala je jedan od ključnih patogenetskih mehanizama odgovornih za nastanak sistemskih učinaka KOPB-a, stoga je predložena redefinicija bolesti kao sastavnice kroničnog sistemskog upalnog sindroma (180,181).

Upalna reakcija je nespecifičan obrambeni odgovor organizma na oštećenje tkiva uzrokovano štetnim podražajem (npr. ozljedom, traumom, stranim česticama, mikroorganizmima), a obilježena je privlačenjem proteina plazme i upalnih stanica u upaljeno područje. Primarna uloga upale je brzo i učinkovito ograničavanje i/ili uklanjanje štetnog utjecaja, uklanjanje oštećenog tkiva i ponovno uspostavljanje homeostaze tkiva. Ako upalna reakcija nije prikladno regulirana, njeni su učinci razorni i mogu rezultirati oštećenjem tkiva i razvojem patoloških poremećaja (182).

Temeljni biljeg sistemske upale je serumski CRP. To je ciklički pentamer iz porodice pentraksina koji se smatra ranim proteinom akutne faze. Sintetizira se u jetri pod utjecajem

IL-6, a u upalnom odgovoru ima ulogu „čistača“ vežući bakterije, oksidirane lipide i apoptozne stanice. Iako nije specifičan za KOPB, najopsežnije je istraživani biljeg u KOPB-u obzirom na jednostavnost i dostupnost njegovog određivanja.

Istraživanja su pokazala da su u stabilnom obliku bolesti koncentracije CRP-a izravno proporcionalne dobi, težini bolesti, zadusi i kvaliteti života bolesnika, a obrnuto proporcionalne FEV_1. Koncentracije CRP-a značajno rastu u egzacerbacijama bolesti, a smanjuju se primjenom inhalacijskih kortikosteroida, ukazujući tako na aktivnost bolesti. Značajan je prediktor smrtnosti, pri čemu rizik raste linearno s porastom koncentracija CRP-a. Osim toga, povećane koncentracije CRP-a povezane su s povećanim rizikom za razvoj KOPB-a (183-187). U našem su istraživanju potvrđene povišene koncentracije CRP-a u bolesnika s KOPB-om (13,5 (8,40 - 46,2) mg/L) u usporedbi sa zdravim ispitanicima (7,7 (2,90 - 9,8) mg/L). Ta činjenica potvrđuje postojanje sistemske kronične upale niskog stupnja u KOPB-u, što je u skladu s rezultatima dostupnim iz dosadašnjih istraživanja.

Molekula fibrinogena sadrži dva seta po od tri različita polipeptidna lanca (Aα, Bβ i γ) koji se spajaju u zajedničku središnju E-domenu. Na svakom kraju tripleta polipeptidnih lanaca nalazi se po jedna periferna D domena. Iako se njegova funkcija prvenstveno veže za hemostazu, fibrinogen se smatra i kasnim proteinom akutne faze (188). Njegove povišene koncentracije potvrđuju prisutnost kronične sistemske upale. Presječna i longitudinalna populacijska istraživanja utvrdila su povezanost koncentracije fibrinogena s rizikom razvoja KOPB-a. Koncentracije fibrinogena obrnuto su proporcionalne funkciji pluća, a više koncentracije ukazuju na brže opadanje funkcije pluća u općoj populaciji, neovisno o pušenju (77,189,190). U serumu bolesnika s KOPB-om dokazane su povišene koncentracije fibrinogena u usporedbi sa zdravim ispitanicima, neovisno o pušačkom statusu (191,192). Naši rezultati potvrđuju povećane koncentracije fibrinogena u ispitivanoj skupini bolesnika s KOPB-om (2,5 (2,1 – 3,3) g/L) u usporedbi sa zdravim ispitanicima (2,2 (1,8 – 2,6) g/L) i postojanje sistemske upale u ispitivanoj skupini bolesnika s KOPB-om.

Na prisutnost sistemskog upalnog procesa u ispitivanoj skupini bolesnika s KOPB-om ukazuju i povećane vrijednosti ukupnih leukocita ($10,7 \pm 4,4 \times 10^9$/L) u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($7,0 \pm 1,8 \times 10^9$/L). Kako su ispitanici s KOPB-om bili u stabilnoj fazi bolesti, koncentracije ispitanih općih pokazatelja sistemske upale nisu se razlikovale usporedbom skupina bolesnika s KOPB-om podijeljenih ovisno o težini bolesti.

Oksidacijski stres je usko povezan s upalnim mehanizmima te se stoga smatra da ima temeljnu ulogu u patogenezi KOPB-a. Dokazi o prisutnosti oksidacijskog stresa u bolesnika s KOPB-om i njegove povezanosti s razvojem ograničenja protoka zraka u plućima su brojni. Oksidacijski stres potječe iz udahnutih okolišnih oksidansa (poglavito onih prisutnih u dimu cigareta) te oksidansa oslobođenih iz fagocita i strukturnih stanica pluća koje su aktivirane u upalnoj reakciji. U širem smislu, oksidacijski stres u KOPB-u obuhvaća sve funkcionalne i strukturne promjene uzrokovane djelovanjem ROS-a. Reaktivni kisikovi spojevi mogu oštetiti DNA, lipide i proteine te na taj način doprinijeti razvoju bolesti. Nadalje, mogu posredovati u aktivaciji niza transkripcijskih faktora i signalnih putova koji doprinose neprestanom poticanju upalne reakcije. Naposljetku, upala i oksidacijski stres postaju samodostatni što pogoduje progresiji KOPB-a i nakon prestanka pušenja (67,72).

Izravno mjerenje ROS-a u biološkim uzorcima radi procjene oksidacijskog stresa nije jednostavno niti klinički primjenjivo zbog njihove izrazite reaktivnosti i kratkog poluživota. Stoga je praktičnije određivati biološke učinke ROS-a na ciljne biomolekule kao neizravne pokazatelje oksidacijskog stresa u organizmu.

Biljezi oksidacijskog stresa u KOPB-u ispitivani su u različitim biološkim uzorcima (perifernoj krvi, bronhoskopskim uzorcima, ispljuvku te kondenzatu izdahnutog zraka) (83,193). Biljezi koji su određivani u bronhoskopskim uzorcima su specifičniji za poremećaj prisutan u plućima, ali je njihova primjena ograničena zbog invazivnosti samog postupka uzorkovanja. Neinvazivnost postupka uzorkovanja čini biljege mjerene u ispljuvku i kondenzatu izdaha dostupnijima, ali metode nisu dovoljno osjetljive, specifične ni reproducibilne. Nausprot tome, periferna krv (plazma ili serum) ima nekoliko prednosti u usporedbi s ostalim vrstama uzorka: neinvazivno uzorkovanje, produljena stabilnost različitih analita te dostupnost standardiziranih, automatiziranih i isplativih metoda za određivanje (194,195). Stoga se naše istraživanje temelji na određivanju biljega sistemskog oksidacijskog stresa u serumu dobro definirane skupine bolesnika s KOPB-om. Istraživani biljezi nisu specifični za bolest, ali su mjereni validiranim metodama primjenjivim u kliničkoj praksi.

Peroksidacija lipida je važna posljedica oksidacijskog stresa, a MDA najčešće mjereni pokazatelj oksidacijskog oštećenja membranskih lipida (84). Povišene koncentracije MDA dokazane su u nizu patoloških stanja i bolesti koji su obilježeni prisutnošću oksidacijskog stresa (maligne, kardiovaskularne, jetrene bolesti, šećerna bolest, preeklampsija). Rezultati nekih istraživanja pokazuju da pušači i bolesnici s KOPB-om imaju povišene koncentracije

MDA u usporedbi s nepušačima i zdravim ispitanicima, što je sukladno našim rezultatima. Koncentracije MDA bile su više u ispitivanoj skupini bolesnika s KOPB-om (13,194 ± 8,320 mmol/L u usporedbi s 9,622 ± 4,628 mmol/L u zdravih ispitanika), a najviše vrijednosti MDA izmjerene su u bolesnika s vrlo teškim oblikom KOPB-a (14,900 (11,025 – 19,375) mmol/L). Koncentracije MDA pozitivno koreliraju s težinom bolesti, dok je nekoliko ispitivanja utvrdilo značajan porast koncentracija MDA u egzacerbaciji bolesti (84,85,88,196-200).

Valja istaknuti da rezultati određivanja MDA u bolesnika s KOPB-om nisu jednoznačni. Naime, neki su autori utvrdili da se koncentracije MDA određene u bolesnika s KOPB-om ne razlikuju od onih određenih u zdravih ispitanika (201,202). Različitost dobivenih rezultata u odnosu na naše istraživanje može se objasniti razlikama u veličini ispitivanog uzorka, definiciji ispitivanih skupina obzirom na simptome i težinu KOPB-a, ali i razlikama u korištenim metodama za određivanje MDA. Prednost našeg istraživanja je upotreba HPLC-a za određivanje nastalog MDA-TBA kompleksa, za razliku od spomenutih istraživanja u kojima se koristila TBARS metoda. Iako jednostavna, jeftina i stoga široko primjenjivana, temeljni su nedostaci TBARS metode nedovoljna specifičnost i osjetljivost te podložnost interferencijama kod određivanja MDA. Osim toga, u upotrebi je niz metodoloških varijacija same TBARS metode što onemogućava prikladnu usporedbu dobivenih rezultata (203,204). Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti značajno povećava specifičnost određivanja MDA, što se odražava na pouzdanost i reproducibilnost dobivenih rezultata, te ju čini pogodnom za upotrebu u rutinskoj analizi (142).

Temeljem navedenog možemo zaključiti da naši rezultati pouzdano ukazuju na prisutnost sistemskog oksidacijskog stresa u bolesnika sa stabilnim KOPB-om, što je posebice bilo izraženo u bolesnika s težim oblikom bolesti (GOLD IV).

Bilirubin je jedna od osnovnih sastavnica antioksidacijskog sustava plazme. Čini se da su koncentracije ukupnog bilirubina snižene u prisutnosti ROS-a. Istraživanja uloge bilirubina i njegovih koncentracija u bolesnika s KOPB-om su rijetka. Horsfall i sur. su pokazali da je smanjenje koncentracije ukupnog bilirubina od 17 μmol/L povezano s 86%-tnim povećanjem smrtnog rizika za KOPB. Zaključili su da su koncentracije bilirubina u serumu obrnuto proporcionalne riziku od razvoja KOPB-a i riziku od smrti općenito. Ove rezultate valja tumačiti s oprezom obzirom da funkcija pluća u spomenutom istraživanju nije mjerena spirometrijom, stoga je valjanost definicije bolesti upitna (131). Nadalje, Apperley i sur. su pronašli pozitivnu korelaciju koncentracija bilirubina s funkcijom pluća i stopom progresije

ograničenja protoka zraka u skupini pušača s blagom i umjerenom KOPB (205). Koncentracije ukupnog bilirubina nisu se razlikovale usporedbom zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om u našem istraživanju. Osim toga, koncentracije bilirubina nisu se razlikovale usporedbom bolesnika podijeljenih ovisno o težini bolesti i prema pušačkim navikama. Naposljetku, koncentracije ukupnog bilirubina u našoj skupini ispitanika s KOPB-om nisu bile povezane s parametrima plućne funkcije (FEV_1 i FEV_1/FVC). Sukladno našim rezultatima, određivanje ukupnog bilirubina ne doprinosi procjeni bolesnika s KOPB-om.

Proteinski tioli su molekule koje sadrže –SH skupinu i imaju važnu ulogu u obrani organizma od štetnog djelovanja ROS-a. Njihove snižene koncentracije predstavljaju pouzdani biljeg suvišnog stvaranja ROS-a u organizmu obzirom da se –SH skupine s lakoćom oksidiraju u prisutnosti oksidacijskog stresa (202). Dosadašnja istraživanja slobodnih proteinskih tiolnih skupina u bolesnika s KOPB-om su ograničena, ali većina ukazuje na snižene koncentracije proteinskih tiola u bolesnika s KOPB, što je u skladu s našim rezultatima (0,086 ± 0,047 mmol/L u oboljelih od KOPB-a; 0,159 ± 0,051 mmol/L u zdravih ispitanika) (93,201,202,206,207). Slobodne tiolne skupine su snižene u KOPB-u u odnosu na zdrave ispitanike već u blagom obliku bolesti. Iako se pokazalo da se koncentracije slobodnih tiolnih skupina u egzacerbacijama bolesti dodatno snizuju, naši rezultati ukazuju da nema razlike u koncentracijama tiola usporedbom bolesnika podijeljenih ovisno o težini KOPB-a. Niske koncentracije slobodnih tiola su sukladne povećanim koncentracijama MDA u bolesnika s KOPB-om i ukazuju na činjenicu da u plazmi bolesnika s KOPB-om (i pušača) postoji sniženi antioksidacijski kapacitet (146).

Najzastupljeniji proteinski tiol u plazmi je albumin. Jedna od njegovih uloga je „čišćenje“ ROS-a i RNS-a prisutnih u perifernoj krvi. Rezultati dosadašnjih istraživanja o ulozi albumina u bolesnika s KOPB-om ukazuju da nema razlike u koncentraciji albumina usporedbom zdravih ispitanika i ispitanika s KOPB-om, te da su usprkos prisutnosti sistemskog oksidacijskog stresa koncentracije albumina u bolesnika sa stabilnom bolešću unutar referentnog raspona (75,85,206). U našem su istraživanju nađene snižene koncentracije albumina u bolesnika s KOPB-om (39,3 ± 5,8 g/L, dok je u zdravih ispitanika 49,2 ± 6,9 g/L), što korelira s nađenim nižim koncentracijama slobodnih tiola. Dodatno, Rahman i sur. su mjereći TEAC dokazali sniženi antioksidacijski kapacitet plazme u skupini bolesnika sa stabilnim KOPB-om i pušača. Obzirom da je TEAC složeni neizravni pokazatelj koji ukazuje na antioksidacijski kapacitet albumina, bilirubina, ceruloplazmina i transferina u plazmi, možemo zaključiti da su naši rezultati očekivani te da ukazuju na poremećaj u sistemskim

antioksidacijskim mehanizmima u bolesnika s KOPB-om (85,207). Nadalje, pokazali smo da koncentracije albumina u našoj skupini bolesnika ne koreliraju s plućnom funkcijom.

Ceruloplazmin svojom oksidaznom aktivnošću značajno doprinosi antioksidacijskom kapacitetu plazme. Obzirom na već spomenute rezultate Rahman i sur., očekivani rezultat bile su snižene koncentracije ceruloplazmina u bolesnika s KOPB-om (85). Suprotno tome, koncentracije ceruloplazmina u našem istraživanju su bile više u bolesnika s KOPB-om (0,599 ± 0,266 g/L) u usporedbi sa zdravim ispitanicima (0,439 ± 0,120 g/L). Vrlo ograničeni dostupni podaci o određivanju ceruloplazmina u pušača i bolesnika s KOPB-om su sukladni našima. U pušača i bolesnika s KOPB-om koncentracije ceruloplazmina su povišene, dok nije nađena razlika u oksidaznoj aktivnosti ceruloplazmina usporedbom zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om (208-210). Ceruloplazmin je pozitivni protein akutne faze, stoga se njegove povećane koncentracije mogu objasniti prisutnošću sistemskog oksidacijskog stresa i sistemske upale u KOPB-u. Rezultati našeg istraživanja pokazuju da ceruloplazmin pozitivno korelira s pokazateljima sistemske upale (CRP-om i fibrinogenom), dok povezanost s pokazateljima sistemskog oksidacijskog stresa (slobodnim tiolima i MDA) nije dokazana. Iz svega navedenog možemo pretpostaviti da su povišene koncentracije ceruloplazmina u našoj skupini bolesnika s KOPB-om pretežno uvjetovane prisutnošću sistemske upale (145).

Ograničeni podaci dostupni iz istraživanja transferina u bolesnika s KOPB-om nisu jednoznačni: koncentracije transferina su snižene, odnosno unutar referentnog raspona (211-213). Naši rezultati ukazuju na snižene koncentracije transferina u bolesnika s KOPB-om (2,29 ± 0,56 g/L) u usporedbi sa zdravim ispitanicima (2,92 ± 0,77 g/L). Koncentracije transferina nisu se razlikovale ovisno o težini bolesti.

Transferin i albumin, pored svojih antioksidacijskih svojstava, su i negativni proteini akutne faze. Naši rezultati ukazuju na postojanje negativne korelacije transferina i albumina s CRP-om. Nadalje, transferin i albumin su pokazali i slabu pozitivnu povezanost s tiolima. Zaključujemo da na koncentracije albumina i transferina u ispitivanoj skupini bolesnika vjerojatno utječu i sistemska upala i sistemski oksidacijski stres (145).

Paraoksonaza je enzim koji se u serumu nalazi vezan za HDL. Njena antioksidacijska svojstva proizlaze iz činjenice da štiti LDL i HDL od lipidne peroksidacije. Dostupna istraživanja pokazuju da su aktivnosti i koncentracije PON1 niže u pušača u usporedbi s nepušačima (214,215). Aktivnost PON1 u bolesnika s KOPB-om ispitana je koristeći različite metode određivanja aktivnosti PON1. Rezultati nisu jednoznačni: u jednom istraživanju autori

navode da nema razlike u PON1 aktivnostima između zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om, dok nekoliko istraživanja pokazuje da su u bolesnika s KOPB-om nađene snižene aktivnosti PON1 u usporedbi sa zdravim ispitanicima (84,216,217). Naši rezultati ukazuju na niže aktivnosti PON1 u bolesnika sa stabilnim KOPB-om (paraoksonazna: 135 (86 - 267) U/L; arilesterazna: 20 (14 - 27) U/L) u usporedbi sa zdravim ispitanicima (paraoksonazna: 168 (132 - 316) U/L; arilesterazna: 43 (30 - 53) U/L). Obzirom da se PON1 nalazi vezan za HDL, snižene koncentracije HDL-a mogu utjecati na inhibiciju aktivnosti PON1 (218). Ispitali smo koncentracije HDL-a u skupini bolesnika s KOPB-om i zdravih ispitanika. Kako nisu nađene razlike u koncentraciji HDL-a između ispitivanih skupina, možemo zaključiti da aktivnost PON1 nije ovisila o koncentracijama HDL-a u našem istraživanju. Razlike u aktivnosti PON1 nisu dokazane niti podjelom ispitanika ovisno o težini KOPB-a, stoga se čini da težina bolesti ne utječe na aktivnosti PON1 u bolesnika s KOPB-om (143). Snižena aktivnost PON1 u oksidacijskom stresu može biti povezana s promjenama u oksidacijskom statusu slobodnih proteinskih tiolnih skupina (219-221). Obzirom da smo dokazali snižene koncentracije tiolnih skupina i snižene koncentracije albumina u bolesnika s KOPB-om, moguće je da su tiolne skupine na PON1 enzimu oksidirane, što utječe na njenu sniženu aktivnost i dodatno pogoršava prisutni oksidacijski stres. Naši rezultati ukazuju da paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 slabo, ali statistički značajno, koreliraju s koncentracijama albumina, što govori u prilog prethodnoj hipotezi.

Pušenje je jedan od najznačajnijih izvora toksičnih kemijskih spojeva kojima je čovjek izložen i najvažniji rizični čimbenik za razvoj KOPB-a. Dim iz cigareta je kompleksna smjesa više od 4700 kemijskih spojeva, a svaki udah dima sadrži 10^{14}-10^{18} slobodnih radikala. Oksidansi u plinovitoj fazi dima cigareta su kratkoživući i pretežito imaju učinke na gornje dišne putove. Nasuprot tome, oksidansi u čvrstoj (katranskoj) fazi dima cigareta sadrže relativno stabilne radikale koji svoje štetne učinke ispoljavaju u plućnom parenhimu (222). Dim iz cigareta uzrokuje razvoj upalnog odgovora u plućima, ali i sistemskog odgovora koji se prvenstveno očituje kao sistemska upala i sistemski oksidacijski stres (74,75). Pušenje se smatra svojevrsnom poveznicom između plućnog i sistemskog upalnog procesa u KOPB-u (76). Povezanost pušenja i KOPB-a temelji se na podacima iz epidemioloških istraživanja, dok se pravi molekularni i stanični mehanizmi utjecaja pušenja na razvoj KOPB-a još uvijek istražuju (12,181,223).

Nije sasvim jasno u kojoj mjeri pušenje doprinosi sistemskom oksidacijskom stresu u KOPB-u, a u kojoj mjeri sama bolest pokreće mehanizme oksidacijskog stresa (222). Kada

smo naše ispitanike podijelili na podskupine u ovisnosti o pušačkom statusu nismo našli razlike u vrijednostima pokazatelja oksidacijskog stresa. Čini se da u našoj skupini ispitanika s KOPB-om bolest predominantno doprinosi razvoju sistemskog oksidacijskog poremećaja, a da je utjecaj pušenja minimalan (145). Dok dim cigareta strukture pluća oštećuje izravnim štetnim (kemijskim) učincima, njegovi se sistemski učinci mogu pripisati posrednim mehanizmima koji se još uvijek istražuju (75).

Iako se dijagnoza i klasifikacija KOPB-a temelje na mjerama koje opisuju isključivo poremećaj plućne funkcije, danas je jasno da FEV_1, koji slabo korelira s fiziološkim i kliničkim varijablama, nije dostatan za potpunu karakterizaciju ovog kompleksnog poremećaja (224-226). U posljednjih nekoliko godina intenzivno raste interes za pronalaskom novih biljega u dijagnozi, klasifikaciji i praćenju bolesnika s KOPB-om. Biljegom se definira molekula ili materijal (stanica, tkivo) koja odražava patobiokemijski poremećaj prisutan u organizmu (227). Prepoznavanje učinkovitijih, specifičnijih i neinvazivnih biljega može omogućiti sveobuhvatniji pristup bolesniku s KOPB-om.

Do sada je u literaturi opisano nekoliko plućnih i sistemskih biljega za procjenu KOPB-a, međutim vrlo ih je malo validirano za specifičnu primjenu, a i podaci o reproducibilnosti rezultata su nepotpuni (194,210).

Jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je procjena dijagnostičke učinkovitosti ispitanih biljega oksidacijskog stresa u procjeni prisutnosti bolesti. Koristeći ROC analizu utvrdili smo da koncentracije ceruloplazmina > 0,519 g/L i koncentracije MDA > 10,900 mmol/L imaju umjerenu dijagnostičku učinkovitost, s AUC = 0,68 za ceruloplazmin i AUC = 0,63 za MDA. Transferin je kod graničnih koncentracija od < 2,46 g/L postigao AUC od 0,78, dok je paraoksonazna aktivnost PON1 kod graničnih koncentracija ≤ 116 U/L imala AUC = 0,71. Ti rezultati pokazuju dobre diskriminacijske karakteristike ovih parametara kod prepoznavanja KOPB-a. Albumini, slobodni tioli i arilesterazna aktivnost PON1 su pokazali najbolju dijagnostičku učinkovitost u razlikovanju zdravih i oboljelih od KOPB-a, što dokazuju i dobivene AUC (0,87 za albumine kod granične vrijednosti ≤ 43,1; 0,86 za slobodne tiole kod granične vrijednosti < 0,103 mmol/L; 0,83 za arilesteraznu aktivnost PON1 kod granične vrijednosti ≤ 28 U/L). Možemo zaključiti da bi se transferin, albumini, slobodni tioli te paraksonazna i arilesterazna aktivnost PON1 mogli koristiti kao pomoćni parametri u dijagnozi KOPB-a (143,145).

Već je prethodno naglašeno da je KOPB kompleksni poremećaj, stoga se koncept upotrebe jednog biljega u karakterizaciji bolesti čini neprikladnim. Upravo je zato jedan od ciljeva našeg istraživanja bio načiniti regresijski model kojim bi se mogla predvidjeti prisutnost bolesti koristeći koncentracije svih ispitanih biljega oksidacijskog stresa.

Kako usporedbom skupina zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om nije nađena razlika u koncentracijama bilirubina, taj parametar nije uključen u regresijsku analizu.

U univarijatni model uključeni su svi preostali biljezi oksidacijskog stresa (ceruloplazmin, albumin, transferin, slobodni tioli, MDA te paraoksonazna i arilesterazna aktivnost PON1). Pokazano je da su visoke koncentracije ceruloplazmina najsnažniji prediktor prisutnosti KOPB-a. Dobrim prediktorima prisutnosti bolesti pokazali su se i povećane koncentracije MDA te snižene paraoksonazne aktivnosti PON1. Suprotno tome, povećane koncentracije albumina, transferina i tiola te povećana arilesterazna aktivnost PON1 u bolesnika s KOPB-om djeluju protekcijski, umanjujući izglede za prisutnost bolesti. Nakon uključivanja svih spomenutih parametara u multivarijatni model, pokazano je da u modelu samo koncentracije ceruloplazmina, albumina, MDA te arilesterazna aktivnost PON1 ostaju prediktivni za prisutnost bolesti. Koeficijent determinacije takvog modela bio je 0,89. To znači da se poznavanjem koncentracija ceruloplazmina, albumina, MDA i arilestrazne aktivnosti PON1 može u 89% bolesnika s KOPB-om ispravno predvidjeti prisutnost bolesti.

Opće karakteristike ispitanika pokazale su da su bolesnici s KOPB-om bili stariji od zdravih ispitanika, da su se udjeli muškaraca i žena u ispitivanim skupinama razlikovali te da su bolesnici s KOPB-om imali niži BMI od zdravih ispitanika. Kako bi u model uključili moguć utjecaj primjećenih razlika, varijable spola, dobi i vrijednosti BMI-a su uključene u regresijski model. Model koji je uključivao ceruloplazmin, albumin, MDA i arilesteraznu aktivnost PON1 prilagođen prema spolu, dobi i BMI-u, imao je koeficijent determinacije 0,95. To znači da se udio bolesnika kojima je ispravno predviđena prisutnost bolesti povećao.

Kada je multiparametrijski regresijski model dodatno prilagođen uključivanjem izmjerenih koncentracija sistemskih biljega upale (CRP-a, fibrinogena te ukupnih leukocita) dobio se koeficijent determinacije od 0,97. To znači da bi se multiparametrijski model koji kombinira poznate koncentracije biljega sistemske upale i sistemskog oksidacijskog stresa mogao koristiti kao vrijedan alat u razlikovanju zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om. Kako bi biljeg (multiparametrijski model u našem slučaju) bio koristan u kliničkoj praksi, mora zadovoljiti nekoliko uvjeta: a) mora biti mjerljiv specifičnim i pouzdanim metodama; b)

mora donositi nove informacije u odnosu na starije biljege (metode) i c) mora biti primjenjiv u liječenju bolesnika (194). Stoga zaključujemo da se potencijalna klinička vrijednost predloženog modela u dijagnostici bolesnika s KOPB-om mora validirati u istraživanjima s dobro definiranim ustrojem i većim brojem ispitanika.

6 ZAKLJUČCI

Rezultati našeg istraživanja ukazuju na sljedeće:

- Ekspresija Hsp70 i Hsp27 bila je najizrazitije potisnuta u skupini pušača s KOPB-om, što vjerojatno doprinosi pogoršanju oksidacijskog stresa u KOPB-u.

- Ekspresija ERK, JNK i p38 MAPK u leukocitima bolesnika s KOPB-om nije se razlikovala od njihove ekspresije u leukocitima zdravih ispitanika. Međutim, aktivacija ispitivanih MAPK pokazala je ovisnost o pušenju i prisutnosti bolesti. Aktivacija ERK je bila posebno naglašena u zdravih nepušača, dok je najizraženija aktivacija JNK i p38 primijećena u skupini pušača s KOPB-om. Poremećaj dinamičke ravnoteže između ERK i stresnih kinaza (JNK i p38) u leukocitima bolesnika s KOPB-om vjerojatno doprinosi razvoju i progresiji sistemske upale.

- Dokazane su povećane koncentracije CRP-a, fibrinogena i ukupnih leukocita u bolesnika s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Ta činjenica potvrđuje postojanje sistemske kronične upale niskog stupnja u KOPB-u.

- Povećane koncentracije ceruloplazmina i MDA, te snižene koncentracije albumina, slobodnih tiolnih skupina, transferina, paraoksonazne i arilesterazne aktivnosti PON1 izmjerene su u bolesnika sa stabilnim KOPB-om. Naši rezultati potvrđuju prisutnost sistemskog oksidacijskog stresa kod bolesnika s KOPB-om.

- Malondialdehid je jedini pokazao povezanost s parametrima za procjenu funkcije pluća. Osim toga, koncentracije MDA su bile najviše u najtežem stadiju KOPB-a. Ostali ispitani biljezi nisu se razlikovali usporedbom skupina bolesnika s KOPB-om podijeljenih prema težini bolesti.

- Ceruloplazmin pozitivno korelira s biljezima sistemske upale (CRP-om i fibrinogenom), dok ne korelira s biljezima sistemskog oksidacijskog stresa (slobodnim tiolima i MDA). Transferin i albumin negativno koreliraju s CRP-om, a pozitivno s tiolima. Stoga su povećane koncentracije ceruloplazmina u ispitanoj skupini bolesnika s KOPB-om pretežno uvjetovane prisutnošću sistemske upale, dok na koncentracije albumina i transferina u ispitivanoj skupini bolesnika vjerojatno utječu i sistemska upala i sistemski oksidacijski stres.

- Biljezi sistemskog oksidacijskog stresa nisu se razlikovali usporedbom skupina bolesnika s KOPB-om podijeljenih ovisno o pušačkom statusu. Čini se da je u skupini ispitanika s KOPB-om izravan utjecaj pušenja na sistemske pokazatelje oksidacijskog stresa minimalan.
- Koristeći model koji uključuje poznate koncentracije ceruloplazmina, albumina, MDA, arilesteraznu aktivnost PON1 i koncentracije sistemskih biljega upale može se uspješno predvidjeti prisutnost bolesti u bolesnika s KOPB-om.

7 LITERATURA

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: updated 2017. Dostupno na: http://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosis-management-prevention-copd/. Datum pristupa: 3. svibnja 2017.

2. Thomashow B, Crapo J, Yawn B, McIvor A, Cerreta S, Walsh J i sur. The COPD foundation pocket consultant guide. J COPD F 2014;1:83-87.

3. Celli BR, MacNee W, and committee members. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ER position paper. Eur Respir J 2004;23:932-46.

4. National Institute for Health and care excellence (NICE). Chronic obstructive pulmonary disease in over 16s: diagnosis and management. Dostupno na: https://www.nice.org.uk/guidance/cg101/resources/chronic-obstructive-pulmonary-disease-in-over-16s-diagnosis-and-management-35109323931589. Datum pristupa: 18. rujna 2016.

5. Decramer M, Janssens W, Miravitlles M. Chronic obstructive pulmonary disease. Lancet 2012;379:1341-51.

6. Braman SS. Chronic obstructive pulmonary disease. Dostupno na:http://books.publications.chestnet.org/book.aspx?bookid=50. Datum pristupa: 3. srpnja 2016.

7. King Han M, Dransfield MT, Martinez F. Chronic obstructive pulmonary disease: Definition, clinical manifestations, diagnosis and staging. Dostupno na:http://www.uptodate.com/contents/chronic-obstructive-pulmonary-disease-definition-clinical-manifestations-diagnosis-and-staging. Datum pristupa: 18. rujna 2016.

8. Viegi G, Pistelli F, Sherill DL, Maio S, Baldacci S, Carrozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. Eur Respir J 2007;30:993-1013.

9. Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL i sur. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. Am J Respir Crit Care Med 2010;82:598-604.

10. Agusti A. The path to personalised medicine in COPD. Thorax 2014;69:1–8.

11. Agusti A, Bel E, Thomas M, Vogelmeier C, Brusselle G, Holgate S i sur. Treatable traits: toward precision medicine of chronic airway diseases. Eur Respir J 2016;47:410–19.

12. Miravitlles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA i sur. A new approach to grading and treating COPD based on clinical phenotypes: summary of the Spanish COPD guidelines (GesEPOC). Prim Care Respir J 2013;22:117-21.

13. Miravitlles M, Calle M, Soler-Cataluña JJ. Clinical phenotypes of COPD: identification, definition and implications for guidelines. Arch Bronconeumol 2012;48:86-98.

14. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Spirometry for health care providers. Dostupno na: http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2016/04/GOLD_Spirometry_2010.pdf. Datum pristupa: 21. prosinca 2016.

15. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A i sur. Standardisation of spirometry. Eur Respir J 2005;26:319–38.

16. King Han M, Dransfield MT, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease: Definition, clinical manifestations, diagnosis, and staging. Dostupno na: https://www.uptodate.com/contents/chronic-obstructive-pulmonary-disease-copd-including-emphysema-beyond-the-basics. Datum pristupa: 18. rujna 2016.

17. Rossi A, Zanardi E. E pluribus plurima: Multidimensional indices and clinical phenotypes in COPD. Respir Res 2011;12:152.

18. Mohamed Hoesein FAA. Zanen P, Lammers JJ. Lower limit of normal or $FEV_1/FVC < 0.70$ in diagnosing COPD: an evidence-based review. Respir Med 2011;105:907-15.

19. Dal Negro RW, Bonadiman L, Turco P. Prevalence of different comorbidities in COPD patients by gender and GOLD stage. Multidiscip Respir Med 2015;10:24.

20. Cavaillès A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S. Comorbidities of COPD. Eur Respir Rev 2013;22:454-75.

21. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. Eur Respir J 2009;33:1165-85.

22. Fragoso E, André S, Boleo-Tomé JP, Areias V, Munhá J, Cardoso J. Understanding COPD: A vision on phenotypes, comorbidities and treatment approach. Rev Port Pneumol 2016;22:101-11.

23. World Health Organization. Burden of COPD. Dostupno na http://www.who.int/respiratory/copd/burden. Datum pristupa: 22. listopada 2016.

24. Anto JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2001;17:982-94.

25. European Respiratory Society. European lung white book. Dostupno na: http://www.erswhitebook.org/. Datum pristupa: 23. studenog 2016.

26. Buist S, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino D i sur. International variation in the prevalence of COPD (The BOLD Study): a population-based prevalence study. Lancet 2007;370:741-750.

27. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Lancet 2004;364:613-620.

28. Celli BR, Halbert RJ, Isonaka S, Schau B. Population impact of different definitions of airway obstruction. Eur Respir J 2003;22:268-273.

29. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. Eur Respir J 2006;28:523-32.

30. Menezes AMB, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muino A, Lopez MV, Valdivia G i sur. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. Lancet 2005;366:1875-81.

31. Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papana A, Theodoratou E i sur. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. J Glob Health 2015;5:020415.

32. Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: updated 2010. Dostupno na http://www.goldcopd.org. Datum pristupa: 28. listopada 2015.

33. Stevanović R, Capak K, Benjak T, ur. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2015. godinu. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2016.

34. Global health dana exchange. Global Burden of Disease Study 2015 (GBD 2015) Data Resources. Dostupno na: http://ghdx.healthdata.org/gbd-2015. Datum pristupa: 16. prosinca 2016.

35. Vestbo J, Lange P. Natural history of COPD: Focusing on change in FEV1. Respirology 2016;21:34-43.

36. Postma DS, Bush A, van den Berge M. Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease. Lancet 2015;385:899-909.

37. Weiss ST. Chronic obstructive pulmonary disease: Risk factors and risk reduction. Dostupno na: http://www.uptodate.com/contents/chronic-obstructive-pulmonary-disease-risk-factors-and-risk-reduction. Datum pristupa: 30. studenog 2016.

38. American Thoracic Society (ATS). American Thoracic Society Statement: Occupational Contribution to the Burden of Airway Disease. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:787-797.

39. Blanc PD. Occupation and COPD: A brief review. COPD: Journal Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2012;49:2-4.

40. Mannino DM, Buist S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. Lancet 2007;370:765-73.

41. Gershon AS, Dolmage TE, Stephenson A, Jackson B. Chronic obstructive pulmonary disease and socioeconomic status: a systematic review. COPD: Journal Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2012;9:216-26.

42. Brashier BB, Kodgule R. Risk factors and pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). J Assoc Physicians India 2012;60:17-21.

43. Antuni JD, Barnes PJ. Evaluation of individuals at risk for COPD: Beyond the scope of the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease. Chronic Obstr Pulm Dis (Miami). 2016;3:653-67.

44. Molfino NA. Genetics of COPD. Chest 2004;125:1929-40.

45. Molfino NA. Current thinking on genetics of chronic obstructive pulmonary disease. Curr Opin Pulm Med 2007;13:107-13.

46. Wood AM, Stockley RA. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. Respir Res 2006;7:130.

47. Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. Chest 2009;135:173-80.

48. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2005;2:258-66.

49. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. Lancet 2004;364:709-21.

50. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. Lancet 2011;378:1015-26.

51. Rahman I, MacNee W. Antioxidant pharmacological therapies for COPD. Curr Opin Pharmacol 2012;12:256-65.

52. MacNee W. ABC of chronic obstructive pulmonary disease: pathology, pathogenesis, and pathophysiology. BMJ 2006;332:1202.

53. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol Rev 2004;56:515-48.

54. Turato G, Zuin R, Saetta M. Pathogenesis and pathology of COPD. Respiration 2001;68:117-28.

55. Fisher BM, Pavlisko E, Voynov JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. International Journal of COPD 2011;6:413-21.

56. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2009;360:2445-54.

57. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Eur J Pharmacol 2001;429:195-207.

58. Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Invest 2012;122:2749-55.

59. Morissette MC, Parent J, Milot J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. International Journal of COPD 2009;4:19-31.

60. Fischer BM, Voynow JA, Ghio AJ. COPD: balancing oxidants and antioxidants. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2015;10:261-76.

61. MacNee W, Tuder RM. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. Proc Am Thorac Soc 2009;6:527–31.

62. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. Eur Respir J 2006;28:219-42.

63. Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. Cell Biochem Biophys 2005;43:167-88.

64. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283:L246-55.

65. Kang MJ, Shadel GS. A Mitochondrial perspective of chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis. Tuberc Respir Dis (Seoul) 2016;79:207–13.

66. Demets IK, Demoor T, Bracke K, Joos GF, Bruselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. Respir Res 2006;7:53

67. Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of cigarette smoke induced chronic obstructive pulmonary disease. Physiol Rev 2007;87:1047-82.

68. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R,Elliott WM, Buzatu L i sur. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2004;350:2645-53.

69. Woodruff PG, Agusti A, Roche N, Singh D, Martinez FJ. Current concepts in targeting COPD pharmacotherapy: making progress towards personalized management. Lancet 2015; 385:1789–98.

70. Ferguson GT, Make B. Management of stable chronic obstructive pulmonary disease. Dostupno na: https://www.uptodate.com/contents/management-of-stable-chronic-obstructive-pulmonary-disease?source=search_result&search=copd%20management&selectedTitle=1~150. Datum pristupa: 16. siječnja 2017.

71. Koršić M, Badovinac S, Roglić M, Čučević B. Liječenje kronične opstruktivne plućne bolesti. Medix 2014;20:179-83.

72. Agusti A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. What we know and what we don't know (but should). Proc Am Thorac Soc 2007;4:522-25.

73. Donner CF, Bjermer L. Clinical commentary – COPD is not a systemic disease. Results from the AIMAR expert opinion consensus/dissensus seminar „COPD is/is not a systemic disease?, Venice, Italy 13-14 November 2008. Respir Med 2009;103:1270-75.

74. Rom O, Avezov K, Aizenbud D, Reznick AZ. Cigarette smoking and inflammation revisited. Respir Physiol Neurobiol 2013;187:5-10.

75. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. Chest 2007;131:1557-66.

76. Eagan TM, Ueland T, Wagner PD, Hardie JA, Mollnes TE, Damas JK, i sur. Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. Eur Respir J 2010;35:540-8.

77. Gan W, Man S, Senthilselvan A, Sin D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. Thorax 2004; 59: 574–80.

78. Shaaban R, Kony S, Driss F, Leynaert B, Soussan D, Pin I, i sur. Change in C-reactive protein levels and FEV1 decline: A longitudinal population-based study. Respir Med 2006;100:2112-20.

79. Thorleifsson SJ, Margretardottir OB, Gudmundsson G, Olafsson I, Benediktsdottir B, Janson C, i sur. Chronic airflow obstruction and markers of systemic inflammation: Results from the BOLD study in Iceland. Respir Med 2009;103:1548–53.

80. Walter RE, Wilk JB, Larson MG, Vasan RS, Keaney JF Jr, i sur. Systemic inflammation and COPD: the Framingham Heart Study. Chest. 2008;133:19-25.

81. Garcia-Rio F, Miravitlles M, Soriano JB, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sánchez G, i sur. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study. Respir Res 2010;11:63.

82. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. Free Radic Biol Med 1996;21:669-81.

83. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem 2006;52:601-23.

84. Zinellu E, Zinellu A, Fois AG, Carru C, Pirina P. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. Respir Res 2016;17:150.

85. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:1055-60.

86. Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation 2005;29:23-32.

87. Rahman I, Skwarska E, MacNee W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 1997;52:565–568.

88. Zeng M, Li Y, Jiang Y, Lu G, Huang X, Guan K. Local and systemic oxidative stress and glucocorticoid receptor levels in chronic obstructive pulmonary disease patients. Can Respir J 2013;20:35–41.

89. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano M, Lynch SM, Shyr Y, i sur. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-Isoprostanes) in smokers — smoking as a cause of oxidative damage. N Engl J Med 1995;332:1198-203.

90. 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 F2 alpha-III, an index of oxidant stress. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:1709-14.

91. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. Chest 2000;117:303S-17S.

92. Ochs-Balcom HM, Grant BJ, Muti P, Sempos CT, Freudenheim JL, Browne RW, I sur. Antioxidants, oxidative stress, and pulmonary function in individuals diagnosed with asthma or COPD. Eur J Clin Nutr 2006;60:991-9.

93. Ahmad A, Shameem M, Husain Q. Altered oxidant-antioxidant levels in the disease prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. Int J Tuberc Lung Dis 2013;17:1104-9.

94. Santos MC, Oliveira AL, Viegas-Crespo AM, Vicente L, Barreiros A, Monteiro P, i sur. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. Biomarkers 2004;9:461-9.

95. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Research 2002;12:9–18.

96. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. J Cell Sci 2005;118:3569-72.

97. Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade. a prototype of MAPK signaling. Mol Biotechnol 2005;31:151-74.

98. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev 1999;79:143-80.

99. Pearson F, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev 2001;22:153-83.

100. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene 2007;26:3100-12.

101. 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;68:320-44.

102. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta 2007;1773:1358-75.

103. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J Cell Physiol 2002;192:1-15.

104. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. Lancet 2003;362:469-76.

105. Tsan MF, Baochong G. Cytokine function of heat shock proteins. Am j Physiol Cell Physiol 2004;286:C739-44.

106. Snoeckx LHEH, Cornelussen RN, van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, van der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. Physiol Rev 2001;81:1461-97.

107. Wheeler DS, Wong HR. The heat shock response and acute lung injury. Free Radic Biol Med 2007;42:1–14.

108. Katschinski DM. On heat and cells and proteins. News Physiol Sci 2004;19:11-5.

109. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, i sur. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. Cell Stress Chaperones 2009;14:105-11.

110. Tóth ME, Gombos I, Sántha M. Heat shock proteins and their role in human diseases. Acta Biologica Szegediensis 2015;59:121-41.

111. Arrigo AP. The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis. Adv Exp Med Biol 2007;594:14-26.

112. Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. Adv Drug Deliv Rev 2009;61:310-8.

113. Prakash M, Shetty MS, Tilak P, Anwar N. Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorders. Online J Health Allied Scs 2009;8:2.

114. Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Selvi E, Colombo G, Milzani A, i sur. Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative stress. Free Radic Biol Med 2012;53:907-15.

115. Rudyk O, Eaton P. Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. Redox Biol 2014;2:803-13.

116. Wouters MA, Iismaa S, Fan SW, Haworth NL. Thiol-based redox signalling: rust never sleeps. Int J Biochem Cell Biol 2011;43:1079-85.

117. Burtis CA, Ashwood AR, Bruns DE, ur. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 2012.

118. Colombo G, Clerici M, Giustarini D, Rossi R, milzani A, Dalle-Donne I. Redox albuminomics: oxidized albumin in human disease. Antioxid Redox Signal 2012;17:1515-27.

119. Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. Ann Intensive Care 2013;3:4.

120. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS Lett 2008;582:1783-87.

121. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-nonenal. Oxid Med Cell Longev 2014;2014:360438.

122. Gomme PT, McCann KB. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. Drug Discov Today 2005;10:267-73.

123. Kell DB. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. BMC Med Genomics 2009;2:2.

124. Healy J, Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. J Neural Transm 2007;114:777-81.

125. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. Annu Rev Nutr 2002;22:439-58.

126. Shukla N, Maher J, Masters J, Angelini GD, Jeremy JY. Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? Atherosclerosis. 2006;187:238-50.

127. Samokyszyn VM, Miller DM, Reif DW, Aust SD. Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. J Biol Chem 1989;264:21-6.

128. Fevery J. Bilirubin in clinical practice: a review. Liver Int 2008;28:592-605.

129. Wagner KH, Wallner M, Mölzer C, Gazzin S, Bulmer AC, Tiribelli C, Vitek L. Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases. Clin Sci (Lond) 2015;129:1-25.

130. Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. Antiox Redeox Signal 2004;6:841-9.

131. Otero Regino W, Velasco H, Sandoval H. The protective role of bilirubin in human beings. Rev Col Gastroenterol 2009;24:287-94.

132. Horsfall LJ, Rait G, Walters K, Swallow DM, Pereira SP, Nazareth I, Petersen I. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death. JAMA 2011;305:691–7.

133. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2005;15:316-28.

134. Całyniuk B, Grochowska-Niedworok E, Walkiewicz KW, Kawecka S, Popiołek E, Fatyga E. Malondialdehyde (MDA) – product of lipid peroxidation as marker of homeostasis disorders and aging. Ann Acad Med Siles 2016;70:224-8.

135. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. Clin Chim Acta 2007;380:50-8.

136. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. J Mol Med 2003;81:766-79.

137. Grdic Rajkovic M, Rumora L, Barisic K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. Biochem Med (Zagreb) 2011;21:122-30.

138. Kulka M. A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications. Pol J Vet Sci 2016;19:225-32.

139. Aşkar TK, Büyükleblebici O. Paraoxonase: a new biochemical marker of oxidant-antioxidant status in atherosclerosis. In: Lushchak V, ed. Oxidative stress - molecular mechanisms and biological effects. InTech, 2012. Dostupno na: https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-molecular-mechanisms-and-biological-effects/paraoxonase-a-new-biochemical-marker-of-oxidant-antioxidant-status-in-atherosclerosis. Datum pristupa: 11. veljače 2017.

140. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. Meth Enzymol 1994;233:380–5.

141. Drury JA, Nycyk JA, Cooke RWI. Comparison of urinary and plasma malondialdehyde in preterm infants. Clin Chim Acta 1997;263:177-85.

142. Domijan AM, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Žanić-Grubišić T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL – application to various biological samples. Biomed Chromatogr 2015;29:41-6.

143. Rumora L, Grdić Rajković M, Milevoj Kopčinović L, Pancirov D, Čepelak I, Žanić Grubišić T. Paraoxonase 1 activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. COPD 2014;11:539-45.

144. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? Biochem Med (Zagreb) 2007;17:10-5.

145. Milevoj Kopčinović L, Domijan AM, Posavac K, Čepelak I, Žanić Grubišić T, Rumora L. Systemic redox imbalance in stable chronic obstructive pulmonary disease. Biomarkers. 2016;28:1-7.

146. Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Žanić Grubišić T, Čepelak I. Reduction in peripheral blood leukocyte heat shoch proteins 27 and 70 expression in chronic obstructive pulmonary disease. Croat Chem Acta 2008;81:73-80.

147. Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Čepelak I, Žanić Grubišić T. Levels changes of blood leukocytes and intracellular signalling pathways in COPD patients with respect to smoking attitude. Clin Biochem 2008;41:387-94.

148. Faner R, Tal-Singer R, Riley JH, Celli B, Vestbo J, MacNee W, i sur. Lessons from ECLIPSE: a review of COPD biomarkers. Thorax 2014;69:666-72.

149. Sin DD, Man SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. Circulation 2003;107:1514-9.

150. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord D, i sur. Behavioral and structural differences in migrating peripheralneutrophils from patients with COPD. Am J Respir Crit Care Med 2011;183:1176-86.

151. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. Mol Cell 2010;40:253-66.

152. Fulda S, Gorman AM,Hori O,Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. International Journal of Cell Biology 2010, Article ID 214074.

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

154. Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. Cell Stress Chaperones 2015;20:885-92.

155. Sõti C, Nagy E, Giricz Z, Vígh L, Csermely P, Ferdinandy P. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. Br J Pharmacol 2005;146:769-80.

156. Wang X, Chen M, Zhou J, Zhang X. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (review). Int J Oncol 2014;45:18-30.

157. 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;25:20-3.

158. Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Large potentials of small heat shock proteins. Physiol Rev 2011;91:1123-59.

159. Arrigo AP, Virot S, Chaufour S, Firdaus W, Kretz-Remy C, Diaz-Latoud C. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. Antioxid Redox Signal 2005;7:414-22.

160. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. J Biol Chem 1997;272:18033-7.

161. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging. FEBS Letters 1998;438:1-4.

162. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. Int Immunol 2000;12:1539-46.

163. Asea A. Mechanisms of HSP72 release. J Biosci 2007;32:579–84.

164. Ünver R, Deveci F, Kırkıl G, Telo S, Kaman D, Kuluöztürk M. Serum heat shock protein levels and the relationship of heat shock proteins with various parameters in chronic obstructive pulmonary disease patients. Turk Thorac J 2016;17:153-9.

165. Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, i sur.Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 alpha in chronic obstructive pulmonary disease: markers for immune activation and tissue destruction. Clin Lab 2009;55:31-40.

166. Ankersmit HJ, Nickl S, Hoeltl E, Toepker M, Lambers C, Mitterbauer A, i sur. Increased serum levels of HSP27 as a marker for incipient chronic obstructive pulmonary disease in young smokers. Respiration 2012;83:391-9.

167. Mercer BA, D'Armiento JM. Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2006;1:137–50.

168. Hoshino S, Yoshida M, , Inoue K, Yano Y, Yanagita M, Mawatari H, i sur. Cigarette smoke extract induces endothelial cell injury via JNK pathway. Biochem Biophys Res Commun 2005;329:58-63.

169. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. Redox Biol 2015;6:183-97.

170. Renda T, Baraldo S, Pelaia G, Bazzan E, Turato G, Papi A, i sur. Increased activation of p38 MAPK in COPD. Eur Respir J 2008;31:62-9.

171. Gaffey K, Reynolds S, Plumb J, Kaur M, Singh D. Increased phosphorilated p38 mitogen-activated protein kinase in COPD lungs. Eur Respir J 2013;42:28-41.

172. 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;7:177-85.

173. 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;80:328-36.

174. 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;155:31-42.

175. Liu C, Russell RM, Wang XD. Low dose beta-carotene supplementation of ferrets attenuates smoke-induced lung phosphorylation of JNK, p38 MAPK, and p53 proteins. J Nutr 2004;134:2705-10.

176. Bennett BL. c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanisms in respiratory disease. Eur Respir J 2006;28: 651–61.

177. McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. Antioxid Redox Signal 2006;8:1775-89.

178. Underwood DC, Osborn RR, Kotzer CJ, Adams JL, Lee JC, Webb EF, i sur.SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. J Pharmacol Exp Ther 2000;293:281-8.

179. Adcock IM, Caramori G. Kinase targets and inhibitors for the treatment of airway inflammatory diseases: the next generation of drugs for severe asthma and COPD? BioDrugs 2004;18:167-80.

180. Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? Lancet 2007;370:797-9.

181. Huertas A, Palange P. COPD: a multifactorial systemic disease. Ther Adv Respir Dis 2011;5:217-24.

182. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. Annu Rev Ecol Evol Syst 2012;43:385-406.

183. Biljak VR, Rumora L, Cepelak I, Pancirov D, Popović-Grle S, Sorić J, i sur. Gamma-glutamyltransferase and C-reactive protein in stable chronic obstructive pulmonary disease. Coll Antropol 2013;37:221-7.

184. MacNee W. Systemic inflammatory biomarkers and co-morbidities of chronic obstructive pulmonary disease. Ann Med 2013;45:291-300.

185. Kelly E, Owen CA, Pinto-Plata V, Celli BR. The role of systemic inflammatory biomarkers to predict mortality in chronic obstructive pulmonary disease. Expert Rev Respir Med 2013;7:57-64.

186. Pinto-Plata CVM, Müllerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, Celli BR. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. Thorax 2006;61:23–8.

187. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2007;175:250–55.

188. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb Haemost 2005;3:1894-904.

189. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Vestbo J, Lange P, Nordestgaard BG. Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2001;164:1008-11.

190. Duvoix A, Dickens J, Haq I, Mannino D, Miller B, Tal-Singer R, Lomas DA. Blood fibrinogen as a biomarker of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 2013;68:670-6.

191. Mannino DM, Ford ES, Redd SC. Obstructive and restrictive lung disease and markers of inflammation: data from the Third National Health and Nutrition Examination. Am J Med 2003;114:758-62.

192. Mannino DM, Valvi D, Mullerova H, Tal-Singer R. Fibrinogen, COPD and mortality in a nationally representative U.S. cohort. COPD 2012;9:359-66.

193. Domej W, Oettl K, Renner W.Oxidative stress and free radicals in COPD - implications and relevance for treatment. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2014;9:1207-24.

194. Kostikas K, Bakakos P, Papiris S, Stolz D, Celli BR. Systemic biomarkers in the evaluation and management of COPD patients: are we getting closer to clinical application? Curr Drug Targets 2013;14:177-91.

195. Stockley RA. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease: confucsing or useful? Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2014;9:163–77.

196. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2005;2:50–60.

197. 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;56:51-6.

198. Montaño M, Cisneros J, Ramírez-Venegas A, Pedraza-Chaverri J, Mercado D, Ramos C, i sur. Malondialdehyde and superoxide dismutase correlate with FEV(1) in patients with COPD associated with wood smoke exposure and tobacco smoking. Inhal Toxicol 2010;22:868-74.

199. Sunnetcioglu A, Alp HH, Sertogullarından B, Balaharoglu R, Gunbatar H. Evaluation of oxidative damage and antioxidant mechanisms in COPD, lung cancer, and obstructive sleep apnea syndrome. Respir Care 2016;61:205-11.

200. Calikoğlu M, Unlü A, Tamer L, Ercan B, Buğdayci R, Atik U.The levels of serum vitamin C, malonyldialdehyde and erythrocyte reduced glutathione in chronic obstructive pulmonary disease and in healthy smokers. Clin Chem Lab Med 2002;40:1028-31.

201. Erden ES, Motor S, Ustun I, Demirkose M, Yuksel R, Okur R, i sur. Investigation of Bisphenol A as an endocrine disruptor, total thiol, malondialdehyde, and C-reactive protein levels in chronic obstructive pulmonary disease. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2014;18:3477-83.

202. Zinellu A, Fois AG, Sotgia S, Zinellu E, Bifulco F, Pintus G, i sur. Plasma protein thiols: an early marker of oxidative stress in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Eur J Clin Invest 2016;46:181-8.

203. Lykkensfeld J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. Clin Chim Acta 2007;380:50-8.

204. Grotto D, Santa Maria L; Valentini J; Paniz C; Schmitt G; Garcia SC, i sur. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quim Nova 2009;32:169-174.

205. Apperley S, Park HY, Holmes DT, Man SF, Tashkin D, Wise RA, i sur. Serum bilirubin and disease progression in mild COPD. Chest 2015;148:169-75.

206. Santos MC, Oliveira AL, Viegas-Crespo AM, Vicente L, Barreiros A, Monteiro P, i sur. Systemic markers of the redox balance in chronic obstructive pulmonary disease. Biomarkers 2004;9:461-9.

207. Rahman I, Swarska E, Henry M, Stolk J, MacNee W. Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? Thorax. 2000;55: 189–93.

208. Engstrom G, Segelstrom N, Ekberg-Aronsson M, i sur. Plasma markers of inflammation and incidence of hospitalisations for COPD: results from a population-based cohort study. Thorax 2009;64:211–15.

209. Galdston M, Levytska V, Schwartz MS, Magnusson B. Ceruloplasmin. Increased serum concentration and impaired antioxidant activity in cigarette smokers, and ability to prevent suppression of elastase inhibitory capacity of alpha1-proteinase inhibitor. Am Rev Respir Dis 1984;129:258–63.

210. Tavilani H, Nadi E, Karimi J, Goodarzi MT. Oxidative stress in COPD patients, smokers, and non-smokers. Respir Care 2012;57:2090–4.

211. Stites S, Nelson ME, Wesselius LJ. Transferrin concentrations in serum and lower respiratory tract fluid of mechanically ventilated patients with COPD or ARDS. Chest 1995;107:1681–5.

212. Driver AG, McAlevy MT, Smith JL. Nutritional assessment of patients with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure. Chest 1982;82:568-71.

213. Comeche Casanova L, Echave-Sustaeta JM, Luján RG, Albarrán Lozano I, Alonso González P, Llorente Alonso MJ. Prevalence of anaemia associated with chronic obstructive pulmonary disease. Study of associated variables. Arch Bronconeumol 2013;49:383-7.

214. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. Biochem Pharmacol 2005;69:541-50.

215. Senti M, Tomás M, Anglada R, Elosua R, Marrugat J, Covas MI, Fitó M. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. Eur J Intern Med 2003;14:178-84.

216. Isik B, Isik RS, Ceylan A, Calik O. Trace elements and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Saudi Med J. 2005;26:1882-5.

217. Stanojkovic I, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Milenkovic B, Vujic T, Stefanovic A, Ivanisevic J. Relationship between bone resorption, oxidative stress and inflammation in severe COPD exacerbation. Clin Biochem 2013;46:1678-82.

218. Milnerowicz H, Kowalska K, Socha E. Paraoxonase activity as a marker of exposure to xenobiotics in tobacco smoke.Int J Toxicol 2015;34:224-32.

219. Nishio E, Watanabe Y. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. Biochem Biophys Res Commun 1997;236:289-93.

220. Naderi M, Hashemi M, Komijani-Bozchaloei F, Moazeni-Roodi A, Momenimoghaddam M. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with pulmonary tuberculosis. Pathophysiology 2011;18:117-20.

221. Jaouad L, de Guise C, Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Fulop T, i sur. Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. Atherosclerosis 2006;185:191-200.

222. Foronjy R, D'Armiento J. The effect of cigarette smoke-derived oxidants on the inflammatory response of the lung. Clin Applied Immunol Rev 2006;6:53-72.

223. Gonçalves RB, Coletta RD, Silverio KG, Benevides L, Casati MZT, da Silva JS, Nociti FH, Jr. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. Inflamm Res 2011;60:409–24.

224. Roche N. Adding biological markers to COPD categorization schemes: a way towards more personalised care? Eur Respir J 2016;47:1601-5.

225. Jones PW, Agusti AG. Outcomes and markers in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 2006;27:822-32.

226. 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;31:267-75.

227. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, i sur. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. Eur Respir J 2008;31:416-69.

8 POPIS KRATICA

Kratica:	Značenje:
AIF	faktor koji potiče apoptozu (AIF, engl. *apoptosis inducing factor*)
ALE	napredni produkti lipidne peroksidacije (ALE, engl. *advanced lipid peroxidation end-products*)
ANOVA	analiza varijance (ANOVA, engl. *analysis of variance*)
AP-1	aktivacijski protein 1 (engl. *activator protein 1*)
Apaf-1	faktor 1 koji aktivira apoptozne proteaze (Apaf-1, engl. *apoptotic protease activating factor 1*)
ATF-2	aktivirajući transkripcijski faktor 2 (ATF, engl. *activating transcription factor 2*)
AUC	površina ispod ROC-krivulje (AUC, engl. *area under curve*)
BAL	bronhoalveolarna tekućina (BAL, engl. *bronchoalveolar lavage*)
BALT	limfatično tkivo bronha (BALT, engl. *bronchial associated lymphatic tissue*)
BMI	indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*)
BODE	BODE indeks (BODE, engl. *body mass index, obstruction, dyspnea, exercise capacity*)
BOLD	studija izračuna opterećenja KOPB-a za društvo (engl. *Burden of Lung Disease*)
BSA	goveđi serumski albumin (BSA, engl. *bovine serum albumin*)
CAT	test za procjenu KOPB-a (CAT, engl. *COPD Assessment Test*)
CCQ	kontrolni upitnik za KOPB (CCQ, engl. *COPD Control Questionnaire*)
CHIP	karboksi-kraj proteina koji stupa u interakciju s Hsc70 (CHIP, engl. *carboxy terminus of Hsc70 interacting protein*)
CI	interval pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*)
COX-2	ciklooksigenaza 2 (COX-2, engl. *cyclooxygenase 2*)
DAMP	molekulska struktura nastala oštećenjem (DAMP, engl. *damage-associated molecular pattern*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*)
ECM	izvanstanični matriks (ECM, engl. *extracellular matrix*)
ELISA	imunoenzimski test (ELISA, engl. *enzyme linked immunosorbent assay*)
ERK 1/2	kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1 i 2 (ERK1 i ERK2, engl. *extracellular signal-regulated kinases1 and 2*)
EU	Europska unija (EU, engl. *European Union*)
FEV1	forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi (FEV1, engl. *forced expiratory volume in one second*)
FRAP	redukcijski potencijal plazme za željezo (FRAP, engl. *ferric reducing ability of plasma*)

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

GM-CSF faktor poticanja kolonija granulocita/makrofaga (GM-CSF, engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GOLD Svjetska inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (GOLD, engl. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*)

GPCR receptor spregnut s G proteinima (GPCR, engl. *G-protein coupled receptor*)

GPx glutation peroksidaza (GPx, engl. *glutathione peroxidase*)

GSH glutation (GSH, engl. *glutathione*)

GTP gvanozin-trifosfat (GTP, engl. *guanosine-5'-triphosphate*)

HDL lipoprotein visoke gustoće (HDL, engl. *high density lipoprotein*)

HIP protein koji stupa u interakciju s Hsp70 (HIP, engl. *Hsp70-interacting protein*)

HNE 4-hidroksi-2-nonenal (HNE, engl. *4-hydroxy-2-nonenal*)

HO-1 hem-oksigenaza 1 (HO-1, engl. *heme oxygenase 1*)

HOP protein koji organizira Hsp70-Hsp90 kompleks (HOP, engl. *Hsp70-Hsp90 organizing protein*)

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*)

HSBP1 vezujući protein faktora toplinskog šoka (HSBP1, engl. *heat shock factor binding protein*)

HSF faktor toplinskog šoka (HSF, engl. *heat shock factor*)

Hsp protein toplinskog šoka (Hsp, engl. *heat shock protein*)

IFNγ interferon γ (IFNγ, engl. *interferon γ*)

I-κB inhibicijski kappa B protein (I-κB, engl. *inhibitory kappa B protein*)

IL interleukin (IL, engl. *interleukin*)

JNK kinaze koje fosforiliraju N-kraj transkripcijskog faktora c-Jun (JNK, engl. *c-Jun N-terminal kinases*)

LDL lipoprotein niske gustoće (LDL, engl. *low density lipoprotein*)

LLN donje granična vrijednost normalnog raspona (LLN, engl. *lower limit of normal*)

LTB4 leukotrien B4 (LTB4, engl. *leukotriene B4*)

MAPK protein-kinaze aktivirane mitogenima (MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MAPKAP protein-kinaze aktivirane MAP-kinazom (MAPKAP, engl. *MAP-kinase activated protein kinase*)

MDA malondialdehid (MDA, engl. *malondialdehyde*)

MIP-1α makrofagni upalni protein 1α (MIP-1α, engl. *macrophage inflammatory protein 1α*)

MKP-1 fosfataza MAP kinaze 1 (MKP-1, engl. *MAP kinase phosphatase-1*)

MMP metaloproteinaza matriksa (MMP, engl. *matrix metalloproteinase*)

mMRC modificirani upitnik Britanskog vijeća za medicinska istraživanja (mMRC, engl. *Modified British Medical Research Council Questionnaire*)

MNK 1/2 kinaze koje stupaju u interakciju s MAPK-signalom 1 i 2 (MNK 1/2, engl. *MAPK-signal-interacting kinases 1 and 2*)

MSK kinaza aktivirana MAP/SAP kinazama (MSK, engl. *MAPK/SAPK-activated kinase*)

NADPH nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH, engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NFAT nuklearni faktor aktiviranih T stanica (NFAT, engl. *nuclear factor of activated T cells*)

NF-κB jezgrin faktor kappa B (NF-κB, engl. *nuclear factor kappa B*)

NK-stanice stanice prirodni ubojice (NK, engl. *natural killer*)

NO dušikov oksid (NO, engl. *nitric oxide*)

NOS sintaza dušikovog oksida (NOS, engl. *nitric oxide synthase*)

OR omjer izgleda (OR, engl. *odds ratio*)

PRRs receptori za prepoznavanje molekulske strukture (PPRs, engl. *pattern recognition receptors*)

ROC analiza diskriminacijskih sposobnosti (ROC, engl. *receiver operating characteristic*)

ROS reaktivni kisikovi spojevi (ROS, engl. *reactive oxygen species*)

RSK ribosomska S6 kinaza (RSK, engl. *ribosomal S6 kinase*)

RTK receptori tirozin kinaze (RTK, engl. *receptor tyrosine kinases*)

SAPK protein-kinaze aktivirane stresom (SAPK, engl. *stress-activated protein kinases*)

SDS-PAGE elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*).

SLPI sekrecijski leukocitni proteazni inhibitor (SLPI, engl. *secretory leukocyte protease inhibitor*)

SOD superoksid-dizmutaza (SOD, engl. *superoxide dismutase*)

TBARS reaktivne tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS, engl. *thiobarbituric acid reactive substances*)

TEAC antioksidacijski kapacitet izražen u Trolox ekvivalentima (TEAC, engl. *Trolox equivalent antioxidant capacity*)

TGF-β transformirajući faktor rasta β (TGF-β, engl. *transforming growth factor β*)

TIMP-2 tkivni inhibitor metaloproteinaze matriksa 2 (TIMP, engl. *tissue inhibitor of metalloproteinase 2*)

Th T-pomagačke stanice (Th, engl. *T-helper cells*)

TNF-α faktor nekroze tumora α (TNF-α, engl. *tumor necrosis factor α*)

TRAIL ligand koji potiče apoptozu povezan s faktorom nekroze tumora (TRAIL, engl. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*)

VEGF vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*)

VEGFR-2 receptor vaskularnog endotelnog faktora rasta 2 (VEGFR-2, engl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*)

9 ŽIVOTOPIS

Lara Milevoj Kopčinović rođena je 1976. godine u Umagu. Studij medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 1995. godine. Diplomski rad pod naslovom „Određivanje koncentracija imunoglobulina E u djece preosjetljive na pelude trava“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Slavice Dodig iz Specijalne bolnice za bolesti dišnog sustava djece i mladeži, brani 25. siječnja 2001. čime stječe titulu dipl. ing. medicinske biokemije.

Od 2002. do 2010. godine zaposlena je u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za traumatologiju. Od 2010. godine zaposlena je u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“. Poslijediplomski doktorski studij iz medicinske biokemije na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisuje 2008. godine. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine polaže 2014. godine, čime stječe titulu spec. medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

Lara Milevoj Kopčinović je koautor 14 stručnih ili znanstvenih radova, od čega je 9 citirano u bazi podataka Current Contents, 1 poglavlja u priručniku te 15 kongresnih sažetaka. Pozvani je predavač na 1 domaćem stručnom skupu. Tehnički je urednik u časopisu Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu *Biochemia Medica.*

10 POPIS RADOVA

Radovi indeksirani u CC časopisima:

1. Juricic G, Saracevic A, **Kopcinovic LM**, Bakliza A, Simundic AM. The evidence for clinically significant bias in plasma glucose between liquid and lyophilized citrate buffer additive. Clin Biochem 2016;49:1402-05.

2. Dukić L, **Milevoj Kopčinović L**, Dorotić A, Baršić I. Blood gas testing and related measurements: National recommendations on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Biochem Med (Zagreb) 2016;26:318–36.

3. Juricic G, Bakliza A, Saracevic A, **Kopcinovic LM**, Dobrijevic S, Drmic S, Simundic AM. Glucose is stable during prolonged storage in un-centrifuged Greiner tubes with liquid citrate buffer, but not in serum and NaF/KOx tubes. Clin Chem Lab Med 2016;54:411-8.

4. **Milevoj Kopcinovic L**, Vogrinc Z, Kocijan I, Culej J, Aralica M, Jokic A, et al. Laboratory testing of extravascular body fluids in Croatia: A survey of the Working group for extravascular body fluids of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Biochem Med (Zagreb) 2016;26:395–407.

5. **Milevoj Kopčinović L**, Domijan AM, Posavac K, Čepelak I, Žanić Grubišić T, Rumora L. Systemic redox imbalance in stable chronic obstructive pulmonary disease. Biomarkers 2016;28:1-7.

6. Juricic G, **Kopcinovic LM**, Saracevic A, Bakliza A, Simundic AM. Liquid citrate acidification introduces significant glucose bias and leads to misclassification of patients with diabetes. Clin Chem Lab Med 2016;54:363-71.

7. Rumora L, Rajković MG, **Kopčinović LM**, Pancirov D, Čepelak I, Grubišić TŽ. Paraoxonase 1 Activity in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. COPD 2014;11:539-45.

8. Rumora L, **Milevoj L**, Popović-Grle S, Barišić K, Čepelak I, Žanić-Grubišić T. Levels changes of blood leukocytes and intracellular signalling pathways in COPD patients with respect to smoking attitude. Clin Biochem 2008;6;387-94.

9. Rumora L, **Milevoj L**, Popović-Grle S, Barišić K, Žanić-Grubišić T, Čepelak I. Reduction in peripheral blood leukocyte heat shock proteins 27 and 70 expression in chronic obstructive pulmonary disease. Croat Chem Acta 2008;81:73-80.

Radovi u ostalim časopisima:

1. **Milevoj Kopcinovic L**, Trifunović J, Pavosevic T, Nikolac N. Croatian survey on critical results reporting. Biochem Med (Zagreb) 2015;25:193–202.

2. **Kopcinovic LM**, Culej J. Pleural, peritoneal and pericardial effusions - a biochemical approach. Biochem Med (Zagreb) 2014;24:123-37.

3. **Milevoj Kopcinovic L**, Pavic M. Platelet satellitism in a trauma patient. Biochem Med (Zagreb) 2012;22:130–4.

4. Pavic M, Bronic A, **Milevoj Kopcinovic L**. Procalcitonin in systemic and localized bacterial infection. Biochem Med (Zagreb) 2010;20:236-41.

5. Pavić M, **Milevoj L**. Platelet count monitoring in burn patients. Biochem Med (Zagreb) 2007;17:212-9.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet **Doktorski rad**

SISTEMSKI BILJEZI OKSIDACIJSKIH I UPALNIH PROMJENA U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI

Lara Milevoj Kopčinović

Kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (KOPB) karakterizira progresivno ograničenje protoka zraka kroz dišne putove i neprimjereni upalni odgovor tkiva pluća na štetne čestice i/ili plinove iz okoline. Temeljne patološke odrednice u KOPB-u su kronična upala i oksidacijski stres. Iako je plućna komponenta KOPB-a izraženija, prisutnost kronične upale i oksidacijskog stresa utvrđena je i u sistemskoj cirkulaciji bolesnika s KOPB-om.

U ovom su istraživanju određeni sistemski biljezi oksidacijskog stresa (albumin, transferin, ceruloplazmin, ukupni bilirubin, slobodne tiolne skupine, malondialdehid (MDA), paraoksonazna i arilesterazna aktivnost paraoksonaze 1 (PON1), te ekspresija i aktivacija unutarstaničnih signalnih molekula Hsp27, Hsp70, ERK, JNK i p38) i biljezi upalnih promjena (CRP, fibrinogen, ukupni leukociti) kod 106 bolesnika sa stabilnim KOPB-om i 45 zdravih ispitanika. Ispitana je povezanost sistemskih antioksidansa s poremećajem funkcije pluća i biljezima sistemske upale, te dijagnostička učinkovitost biljega sistemskog oksidacijskog stresa u razlikovanju zdravih i oboljelih od KOPB-a.

Rezultati su pokazali povišene koncentracije ceruloplazmina i MDA, snižene koncentracije albumina, transferina i tiola, te snižene obje ispitane aktivnosti PON1 kod bolesnika s KOPB-om. Model koji je uključivao ceruloplazmin, albumin, MDA i arilesteraznu aktivnost PON1 te biljege sistemske upale pokazao je najbolju dijagnostičku učinkovitost u predviđanju KOPB-a. Razina ekspresije Hsp27 i Hsp70 u leukocitima periferne bila je najniža kod pušača s KOPB-om. Aktivacija ERK bila je značajnija kod zdravih i bolesnih nepušača, dok je aktivacija JNK i p38 bila najizraženija kod pušača s KOPB-om. Dijagnostičke karakteristike predloženog modela koji kombinira poznate koncentracije biljega sistemske upale i sistemskog oksidacijskog stresa ukazuju da bi se on mogao koristiti kao vrijedan alat u razlikovanju zdravih ispitanika i bolesnika s KOPB-om.

Rad sadrži: 126 stranica, 11 slika, 16 tablica, 227 literaturna navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: KOPB; sistemski oksidacijski stres; sistemska upala; MAPK, Hsp

Mentor: prof. dr. sc. Lada Rumora, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: dr. sc. Tihana Žanić Grubišić, red. prof. u mir. Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
izv. prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
izv. prof. dr. sc. Ana-Marija Domijan, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zamjena: prof. dr. sc. József Petrik, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Datum prihvaćanja rada: 12. srpnja 2017.

Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry **Doctoral thesis**

SYSTEMIC BIOMARKERS OF OXIDATIVE AND INFLAMMATORY ALTERATIONS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Lara Milevoj Kopčinović

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by progressive airflow limitation and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs to environmental noxious particles and/or gases. The primary pathological changes in COPD are chronic inflammation and oxidative stress. Although the pulmonary component of COPD is more prominent, the presence of systemic chronic inflammation and systemic oxidative stress was confirmed in patients with COPD.
Methods: We investigated markers of systemic oxidative stress (albumin, transferrin, ceruloplasmin, total bilirubin, thiols, malondialdehyde (MDA), and paraoxonase and aryesterase activity of paraoxonase 1 (PON1), and the expression and activation of intracellular signalling molecules Hsp27, Hsp70, ERK, JNK i p38) and systemic inflammation (CRP, fibrinogen, total leukocytes) in 106 patients with stable COPD and 45 healthy subjects. The association of systemic antioxidants with indicators of lung function and systemic inflammation, and the diagnostic accuracy of systemic oxidative stress parameters in distinguishing between healthy subjects and patients with COPD were also evaluated.
Results: Higher ceruloplasmin and MDA concentrations, and lower albumin, transferrin, thiols and PON1 activities (paraoxonase and arylesterase) were found in patients with COPD. The model combining ceruloplasmin, albumin, MDA, arylesterase PON1 activity, and markers of systemic inflammation demonstrated good diagnostic performances. The decrease in expression of peripheral blood leukocytes' Hsp27 and Hsp70 was most prominent in COPD smokers. ERK activation was stimulated in healthy and COPD non-smokers, while JNK and p38 activation was most pronounced in COPD smokers.
Conclusions: Our results showed that COPD affects the intracellular signalling pathways investigated. Improved understanding of these molecular mechanisms could help identify novel targets for diagnosis and therapeutic interventions in COPD. The diagnostic characteristics of the proposed model, obtained combining markers of systemic inflammation and systemic oxidative stress, suggest its potential value as additional tool in COPD diagnosis.

Thesis includes: 126 pages, 11 figures, 16 tables, 227 references; originally written in Croatian

Keywords: COPD, systemic oxidative stress, systemic inflammation, MAPK, Hsp

Supervisor: Full Professor Lada Rumora, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Reviewers: Full Professor Tihana Žanić Grubišić, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Associate Professor Sanja Popović-Grle, PhD, Faculty of Medicine University of Zagreb
Associate Professor Ana-Marija Domijan, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Substitute: Full Professor József Petrik, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Thesis accepted: July 12th, 2017

The Thesis is deposited at the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry and the University Library.