

Protuupalni učinci statina u bolesnika s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti

Marević, Sanja

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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:163:870046>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

SANJA MAREVIĆ

**PROTUUPALNI UČINCI STATINA U
BOLESNIKA S KRONIČNOM
OPSTRUKCIJSKOM PLUĆNOM BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

SANJA MAREVIĆ

**PROTUUPALNI UČINCI STATINA U
BOLESNIKA S KRONIČNOM
OPSTRUKCIJSKOM PLUĆNOM BOLESTI**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. József Petrik

izv. prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

SANJA MAREVIĆ

ANTIINFLAMMATORY EFFECTS OF STATINS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASES

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

prof. dr. sc. József Petrik

associate prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle

Zagreb, 2019.

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.

ZAHVALE

Mentoru prof. dr. sc. Józsefu Petriku na pomoći, savjetima i podršci tijekom izrade doktorskoga rada

Mentorici izv. prof. dr. sc. Sanji Popović-Grle na pomoći, savjetima i podršci tijekom izrade doktorskoga rada

Medicinskoj sestri Seniji Mustić i osoblju Klinike za plućne bolesti "Jordanovac"

prof. dr. sc. Ivani Čepelak, na savjetima oko pisanja članaka

Dr. sc. Renati Laškaj, voditeljici Odjela za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju s citologijom Klinike za infektivne bolesti "Dr.Fran Mihaljević" na podršci tijekom izrade doktorskog rada

Osoblju Odjela za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju s citologijom Klinike za infektivne bolesti "Dr.Fran Mihaljević"

Doc. dr. sc. Snježani Židovec Lepej, voditeljici Odjela za protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti "Dr.Fran Mihaljević" na podršci i savjetima tijekom izrade doktorskog rada

Dr. sc. Ivani Grgić i dr. sc. Lani Gorenec s Odjela za protočnu citometriju Klinike za infektivne bolesti "Dr.Fran Mihaljević"

I bolesnicima s kroničnom opstrukcijskom plućnom bolesti koji su sudjelovali u ovoj studiji.

I naposljetku hvala mojoj obitelji na velikom strpljenju i podršci...

SAŽETAK

Statini su inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze koji se primjenjuju za smanjenje sinteze endogenog kolesterola kod pojedinih vrsta hiperlipoproteinemija. Međutim, statini pokazuju i pleiotropne učinke te se smatra da utječu na upalu, oksidacijski stres, oslobađanje citokina i apoptozu pojedinih staničnih vrsta. Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) je kronična upalna bolest pluća sa sistemskom upalom te se smatra da bi lijekovi koji utječu na prisutni upalni proces mogli doprinjeti poboljšanju stanja u bolesnika s KOPB-om. Hipoteza ovoga istraživanja je da statini posjeduju protuupalni učinak koji bi mogao usporiti progresiju KOPB-a.

U istraživanje je bilo uključeno 100 bolesnika sa stabilnim KOPB-om, na terapiji statinima dulje od godinu dana (N=66) i bez terapije statinima (N=34). Svim bolesnicima je određena koncentracija citokina: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ , TNF- α i TNF- β u plazmi metodom protočne citometrije. Relativni udio apoptoze i nekroze leukocita odnosno subpopulacija granulocita, limfocita i monocita određen je također metodom protočne citometrije. Spirometrijski, biokemijski i hematološki parametri određeni su u svih bolesnika.

Citokini IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α pokazali su statistički značajno smanjenje koncentracije u bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima u odnosu na bolesnike s KOPB-om bez terapije statinima. Hijerarhijska klusterska analiza pokazala je nekoliko klastera u bolesnika s KOPB-om u skladu s vrijednostima citokina. Citokinski uzorci bili su u velikoj skupini pacijenata slični s umjerenim povećanjem vrijednosti citokina. Bolesnici s KOPB-om koji su uzimali statine pokazali su različit obrazac/uzorak citokina s nižim vrijednostima citokina. Koncentracije citokina nisu pokazale statistički značajnu razliku ovisno o podjeli bolesnika prema težini oboljenja odnosno GOLD stadiju.

Statistički značajno snižene koncentracije citokina IL-4, IL-8 i IL-10 su bile prisutne u bolesnika s KOPB-om s povišenim ITM-om ($> 25 \text{ kg/m}^2$) u odnosu na bolesnike s normalnim ITM-om ($20 - 25 \text{ kg/m}^2$). U perifernoj krvi relativni udio svih leukocita, te subpopulacije limfocita i monocita u apoptozi pokazali su statistički značajno smanjenje u bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima u odnosu na bolesnike s KOPB-om bez terapije statinima.

Rezultati istraživanja pružaju uvid u pleiotropne učinke statina u bolesnika s KOPB-om. U ovom radu u bolesnika s KOPB-om, pored djelovanja statina na smanjenje koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola, pokazali smo i pleiotropne učinke statina na koncentracije citokina,

koji su ključni medijatori lokalne i sistemske upale u KOPB-u, te na apoptozu leukocita periferne krvi. Mjerenje panela citokina, a ne samo pojedinog citokina, pruža uvid u karakteristične obrasce citokina u bolesnika s KOPB-om. Postoji prisutan Th1 (IL-2 i TNF- α) i Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) citokinski obrazac kod stabilnih bolesnika s KOPB-om.

Ključne riječi: KOPB, statini, citokini, apoptoza

SUMMARY

Background: Statins are 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors used to reduce the endogenous cholesterol synthesis in some types of hyperlipoproteinemia. However, statins also show pleiotropic effects and are thought to affect inflammation, oxidative stress, release of cytokines and apoptosis of certain cell types. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic inflammatory disease of the lungs with systemic inflammation and it is considered that drugs that affect the present inflammatory process could contribute to improving the condition in patients with COPD. The hypothesis of this study is that statins possess an anti-inflammatory effect that could slow the progression of COPD.

Methods: The study included 100 patients with stable COPD, who received statin therapy for longer than one year (N = 66) and no statin therapy (N = 34). Cytokine concentration of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ , TNF- β was measured in plasma, by flow cytometry. The relative percentage of apoptotic and necrotic leukocytes, populations of granulocytes, lymphocytes and monocytes was determined by flow cytometry. Spirometry, biochemical and hematological parameters were determined in all patients.

Results: Cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- α showed a statistically significant decrease of concentrations in patients with COPD on statin therapy compared to patients without statin therapy. Hierarchical cluster analysis showed several clusters in COPD patients in accordance with cytokine values. Cytokine patterns were in a large group of patients similar with a moderate increase in the cytokine levels. COPD patients who received statins showed a different pattern of cytokines with lower cytokine values. Cytokine concentrations did not show a statistically significant difference depending on the severity of the disease, according to GOLD stages. A statistically significant decrease of cytokine levels IL-4, IL-8 and IL-10 was present in patients with COPD with a body mass index (BMI) > 25 kg/m² compared to patients with normal BMI 20-25 kg/m². In peripheral blood, the relative percentage of all leukocytes, as well as the lymphocyte and monocyte subpopulations in apoptosis, showed a statistically significant decrease in COPD patients on statin therapy compared with COPD patients without statin therapy.

Conclusions: The results of the study provide an insight into pleiotropic effects of statins in patients with COPD. In our patients with COPD, the statins reduced cholesterol and LDL

cholesterol levels, but we also demonstrated pleiotropic effects of statins on cytokines, both local and systemic inflammatory mediators in COPD, as well as on apoptosis of peripheral blood leukocytes. The measurement of the cytokine panel, not just a single cytokine, provides an insight into cytokine patterns that are present in COPD patients. There is a Th1 (IL-2 i TNF- α) and Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) cytokine pattern present in stable COPD patients.

Keywords: COPD, statins, cytokines, apoptosis

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	Statini.....	2
1.1.1	Pleiotropni učinci statina	5
1.2	Citokini	9
1.2.1	Interleukin-1 β (IL-1 β).....	12
1.2.2	Interleukin-2 (IL-2).....	13
1.2.3	Interleukin-4 (IL-4).....	14
1.2.4	Interleukin-5 (IL-5).....	15
1.2.5	Interleukin-6 (IL-6).....	15
1.2.6	Interleukin-8 (IL-8).....	16
1.2.7	Interleukin-10 (IL-10).....	17
1.2.8	Interleukin-12 p70 (IL-12p70).....	17
1.2.9	Interferon- γ (IFN- γ)	18
1.2.10	Čimbenik tumorske nekroze- α (TNF- α)	18
1.2.11	Čimbenik tumorske nekroze- β (TNF- β)	19
1.3	Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB)	21
1.3.1	Definicija kronične opstruktivske plućne bolesti.....	21
1.3.2	Patogeneza i patofiziologija kronične opstruktivske plućne bolesti	25
1.3.3	Komorbiditeti kronične opstruktivske plućne bolesti	29
1.3.4	Fenotipovi kronične opstruktivske plućne bolesti	31
1.3.5	Kronična opstruktivska plućna bolest i statini	32
1.3.6	Kronična opstruktivska plućna bolest i citokini.....	33
1.3.7	Apoptoza i nekroza stanica kod kronične opstruktivske plućne bolesti	37
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	40
3.	MATERIJALI I METODE	43
3.1	Materijali	43
3.1.1	Ispitanici	43
3.1.2	Reagensi.....	44
3.2	Metode.....	45

3.2.1	Spirometrija	45
3.2.2	Hematološki i biokemijski parametri.....	46
3.2.3	Procjena glomerularne filtracije MDRD jednadžbom	47
3.2.4	Određivanje pušačkih godina	48
3.2.5	Određivanje koncentracije citokina protočnom citometrijom	49
3.2.6	Određivanje apoptoze i nekroze	54
3.2.6.1	Određivanje broja apoptoznih i nekroznih stanica s Aneksin-V-FITC i CD45- antitijelom.....	54
3.2.6.2	Određivanje stanica u apoptozi TUNEL metodom.....	57
3.2.7	Statistička analiza	58
4.	REZULTATI.....	59
4.1	Prikaz rezultata ovisno o terapiji statinima	59
4.1.1	Citokini	59
4.1.2	Biokemijski i hematološki parametri.....	69
4.1.3	Korelacija i hijerarhijska klaster analiza citokina.....	73
4.1.4	Udio apoptoznih i nekroznih leukocita.....	77
4.2	Rezultati bolesnika s KOPB-om prema GOLD klasifikaciji.....	82
4.3	Rezultati koncentracije citokina prema pušačkim godinama, indeksu tjelesne mase, terapiji inhalacijskim kortikosteroidima i hipertenziji	86
5.	RASPRAVA.....	91
6.	ZAKLJUČCI	103
7.	LITERATURA.....	104
8.	POPIS KRATICA	118
9.	ŽIVOTOPIS	122

1. UVOD

Statini su inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze (1,2). Statini se koriste za inhibiciju sinteze i smanjenje koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola kod pojedinih vrsta hiperlipoproteinemija (3). Koriste se kako bi se smanjio rizik od kardiovaskularnih bolesti, ali kliničke studije pokazuju korist od primjene statina i u bolestima koje nisu vezane uz povećanu koncentraciju LDL-kolesterola (1,2,4). Statini tako pokazuju pleiotropni i protuupalni učinak u kardiovaskularnim, plućnim i infektivnim bolestima (5).

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) je progresivna kronična upalna bolest pluća sa sistemskim manifestacijama i brojnim komorbiditetima (6). Glavni uzročnik nastanka KOPB-a je duhanski dim (7). Danas dostupna terapija za KOPB za sada ne zaustavlja progresiju bolesti (5–8). Jedino prestanak pušenja usporava razvoj bolesti i produljava životni vijek bolesnika (5–8). Obzirom da je KOPB kronična upalna bolest pluća sa sistemskom upalom smatra se da bi lijekovi koji utječu na prisutni upalni proces mogli doprinjeti poboljšanju stanja u bolesnika s KOPB-om (5,8). Postoje studije koje pokazuju da bi upotreba statina u bolesnika s KOPB-om mogla imati utjecaj na usporavanje razvoja bolesti (9). Retrospektivne studije su pokazale da su bolesnici s KOPB-om na terapiji sa statinima imali manji mortalitet, manji broj hospitalizacija te da je kod njih smanjena uporaba antibiotika (10,11).

1.1 Statini

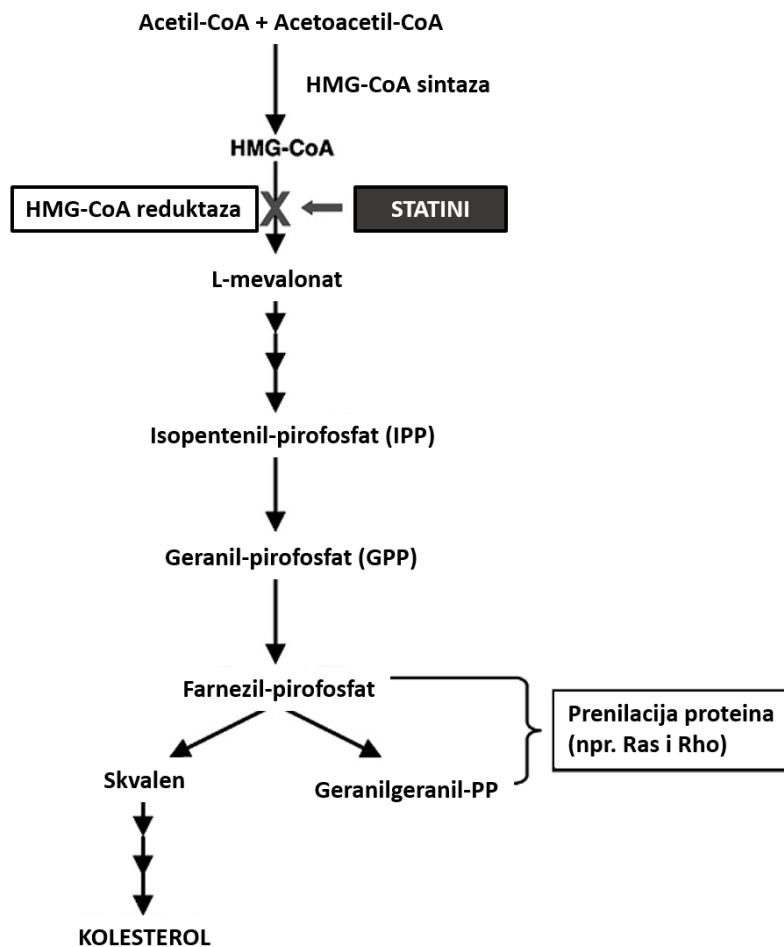
Statini su inhibitori HMG-CoA reduktaze. To je skupina lijekova koji smanjuju koncentraciju ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola (lipoproteini niske gustoće, *engl. low density lipoproteins*, LDL) u cirkulaciji. Koriste se kako bi se smanjio rizik od kardiovaskularnih bolesti, ali pokazuju i pleiotropne učinke (1,2).

Statine su otkrili japanski znanstvenici Akira Endo i Masao Kuroda, 1971. godine (12). Istraživali su određene plijesni i otkrili da luče citrinin koji inhibira HMG-CoA reduktazu i snižava koncentraciju kolesterola kod štakora (12). Citrinin je pokazao toksično djelovanje na bubrege, ali nakon toga su Endo i suradnici otkrili kompaktin (ML-236B) koji je također inhibirao HMG-CoA reduktazu (12). Prvi komercijalni statin, lovastatin, odobrila je 1987. Američka agencija za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration*, FDA) (12). Nakon toga, odobreno je još šest komercijalnih statina – dva polu-sintetska (simvastatin i pravastatin) i četiri sintetska (fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin i pitavastatin) (12). Trenutno su na tržištu dostupni: simvastatin, pravastatin, rosuvastatin, atorvastatin, fluvastatin, pitavastatin i lovastatin, koje je odobrila FDA (13). U Hrvatskoj su u upotrebi i odobreni od Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) sljedeći statini: fluvastatin, rosuvastatin, atorvastatin i simvastatin (14). Statini se koriste za sekundarnu prevenciju u bolesnika koji su preboljeli akutni infarkt miokarda (AIM), ishemijski cerebralni infarkt, tranzitornu ishemičnu ataku, ultrazvukom dokazani plak na karotidi ili perifernu arterijsku okluzivnu bolest, u bolesnika koji boluju od koronarne bolesti dokazane koronarografijom ili testom opterećenja te u bolesnika koji boluju od šećerne bolesti uz vrijednosti ukupnog kolesterola iznad 5 mmol/L (15). Statini se u primarnoj prevenciji koriste u bolesnika kojima je, nakon tri mjeseca pridržavanja preporučene dijeta, vrijednost ukupnog kolesterola iznad 7 mmol/L i to u dva laboratorijska nalaza u razmaku od tri mjeseca (15).

Statini smanjuju koncentraciju kolesterola u stanicama selektivnom inhibicijom enzima HMG-CoA reduktaze, te time ograničavaju biosintezu kolesterola i smanjuju sintezu kolesterola u jetri (16). Posljedično dolazi do povećane ekspresije LDL-receptora u membrani stanica jetre i povećava se klirens LDL-kolesterola iz krvi. U bolesnika s kombiniranom hiperlipidemijom statini smanjuju i količinu apo B100, te dolazi do smanjenja koncentracije i kolesterola i triglicerida (16). Statini inhibiraju "put mevalonata" u biosintezi kolesterola, ali posljedično osim kolesterola, smanjena je i sinteza drugih produkata koji nastaju iz mevalonata (16). Izoprenoidni put je također

pogođen te je smanjena sinteza ubikinona (sudjeluje u transportu elektrona u mitohondriju), dolikola (potreban za sintezu glikoproteina) i izopentenil-adenina (sastavni dio transfer-RNA) koji je također prisutan i u unutarstaničnim signalnim molekulama, kao što je RhoA (16). Tako da smanjenjem biosinteze kolesterola, ali čini se i izoprenoida, statini pokazuju svoje učinke na vaskularni sustav (16). Slika 1. pokazuje djelovanje statina na put biosinteze mevalonata i njegovih produkata.

Statini su do danas jedna od najispitivanijih skupina lijekova te meta-analize pokazuju učinkovitost i sigurnost primjene statinske terapije (17). Međutim, moguće su nuspojave koje se javljaju prilikom upotrebe statina kao što su: miopatija koja se očituje kao bol, osjetljivost na dodir ili slabost u mišićima s povećanjem aktivnosti kreatin-kinaze (CK) više od 10 puta od gornje granice referentnog intervala. Miopatija se može katkad razviti u rabdomiolizu s akutnim zatajenjem bubrega ili bez akutnog zatajenja bubrega kao posljedica mioglobinurije, a vrlo rijetko bili su zabilježeni i smrtni slučajevi (18). Nuspojava terapije statinima može biti i povećanje aktivnosti serumskih transaminaza. Ako vrijednosti transaminaza imaju tendenciju povećanja i trajno su visoke i ako se povećaju više od tri puta od gornje granice referentnog intervala, treba prekinuti liječenje statinima (18). Neki dokazi upućuju na to da statini povećavaju koncentraciju glukoze u krvi kod nekih bolesnika, koji su pod povećanim rizikom od razvoja dijabetes melitusa te da mogu izazvati hiperglikemiju koju je primjereno liječiti na način kako se liječi dijabetes melitus (DM) (18). Kod primjene pojedinih statina, kao što je simvastatin, postoje prijavljeni slučajevi intersticijske plućne bolesti, osobito pri dugotrajnom liječenju (18).



Slika 1. Mjesto djelovanja statina, na HMG-CoA reduktazu, u biosintetskom putu kolesterola.

Slika preuzeta iz (16).

Razgranati put metabolizma mevalonata, koji ukazuje na mjesto djelovanja statina i brojnih krajnjih produkata reakcije HMG-CoA reduktaze, uključujući molekule kolesterola i izoprenoida, regulira različite stupnjeve metabolizma, upale i dr.

1.1.1 Pleiotropni učinci statina

Iako se statini koriste za inhibiciju sinteze i sniženje koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola kako bi se smanjio rizik od komplikacija ateroskleroze i time kardiovaskularnih događaja, novije studije pokazuju da statini posjeduju i pleiotropne učinke (3).

Kliničke studije pokazuju korist od primjene statina i u bolestima koje nisu vezane uz povećanu koncentraciju LDL-kolesterola (4). Statini tako pokazuju pleiotropni i protuupalni učinak u kardiovaskularnim, plućnim i infektivnim bolestima (5). Smatra se da smanjuju incidenciju i mortalitet kod pneumonije, smanjuju učestalost venske tromboembolije, kod reumatoidnog artritisa smanjuju mortalitet i koncentraciju upalnih markera, kod bubrežne bolesti utječu na smanjenje koncentracije kreatinina te moguće i na smanjenje stvaranja žučnih kamenaca (4). Neki od ishoda ovih bolesti bi mogli biti u vezi s direktnim smanjenjem koncentracije kolesterola od strane djelovanja statina (4). Sniženje koncentracije kolesterola može doprinositi smanjenju agregacije trombocita što dovodi do manje učestalosti duboke venske tromboze (DVT). Kod bolesti bubrega smanjenje kolesterola može doprinositi smanjenju ateroskleroze renalnih arterija te smanjuje napredovanje bubrežne bolesti, a manje stvaranje žučnih kamenaca je moguća posljedica smanjene sinteze kolesterola u jetri (4).

Prema rezultatima većine kliničkih studija teško je razlučiti korist od učinka statina na koncentraciju LDL-kolesterola od njihovog potencijalnog pleiotropnog djelovanja (4). Pleiotropni učinci statina koji su posredovani inhibicijom sinteze izoprenoida koreliraju s inhibicijom biosinteze kolesterola i teško ih je kvantificirati (4). Naime, inhibicijom sinteze mevalonske kiseline, statini sprječavaju sintezu izoprenoidnih međuprodukata farnezilpirofosfata (FPP) i geranilgeranilpirofosfata (GGPP) (2,4). Inhibicija sinteze izoprenoidnih međuprodukata bi mogla imati važnu ulogu za mogući pleiotropni učinak statina (2,4). Smanjenje u izoprenilaciji signalnih molekula, kao što su Ras, Rho i Rac dovodi do modulacije raznih signalnih putova (2,4). Ras i Rho reguliraju proliferaciju stanica, diferencijaciju, apoptozu i citoskelet (2,4). FPP i GGPP služe kao lipidni veznici za post-translacijske modifikacije heterotrimernih G-proteina, uključujući Ras i Rho (2,4). U endotelnim stanicama, translokacija Ras-a je ovisna o farnezilaciji, dok je translokacija Rho ovisna o geranilgeranilaciji (2,4). Rho kinaze (ROCK) su serin-treoninske protein-kinaze, molekulske mase oko 160 kDa, koje doprinose učincima Rho gvanozin-trifosfataza (GTP-aza). ROCK reguliraju promjene u aktinskom citoskeletu fosforilacijom lakog lanca miozina (2,4). Na

taj način utječu na fokalnu adheziju i stvaranje kompleksa, kontrakciju glatkih mišića, migraciju stanica i ekspresiju gena (2,4). Kod regulacije ciklusa Rho GTP-aze, Rho se mijenja od citoplazmatski inaktivnog gvanozin-difosfat (GDP) vezanog oblika nakon geranilgeranilacije i translokacijom dopire u staničnu membranu te se aktivira vezanjem gvanozin-trifosfata (GTP) (4). Inhibicijom sinteze mevalonata, a putem djelovanja statina, smanjuje se koncentracija geranilgeranil pirofosfata i sprječava se geranilgeranilacija Rho i time aktivacija ROCK-a. ROCK posreduje u "nizvodnim" učincima Rho-a i utječe na endotelne stanice, upalne stanice, fibroblaste, kardiomiocite i vaskularne glatke mišićne stanice koje sudjeluju u procesu ateroskleroze (4). Ovi procesi bi mogli imati ulogu i biti odgovorni za pleiotropne učinke statina (4).

Pleiotropni učinci statina se razlikuju ovisno o tipu stanica (4). U endotelnim stanicama djelovanjem statina dolazi do: smanjenja ekspresije i aktivnosti endotelne dušik-oksidge (eNOS), smanjena je ekspresija inhibitora 1 aktivatora plazminogena (PAI-1), povećana je ekspresija tkivnog aktivatora plazminogen (*engl. tissue plasminogen activator*, tPA), smanjena je ekspresija i sinteza endotelina-1 (ET-1), smanjena je koncentracija reaktivnih kisikovih spojeva (*engl. reactive oxygen species*, ROS), te je smanjena ekspresija pojedinih upalnih citokina kao što su interleukin-1 β (IL-1 β) i interleukin-6 (IL-6) (4). Nadalje, u glatkim mišićnim stanicama dolazi do promjena u proliferaciji i migraciji, smanjena je koncentracija ROS-a i aktivnost nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidge, u miokardu je smanjena aktivnost NADPH oksidge i smanjena je koncentracija ROS-a, smanjena je apoptoza i uočeno je povećanje koncentracije dušik-II-oksida (NO) (4). Djelovanjem statina trombociti pokazuju manju reaktivnost, monociti/makrofagi pokazuju smanjenu ekspresiju i sekreciju metaloproteinaza matriksa (MMP), smanjeni su upalni citokini IL-1 β , IL-6, interleukin-8 (IL-8) i tumorski čimbenik nekroze- α (*engl. tumor necrosis factor-alpha*, TNF- α) (4). Kod vaskularne upale djelovanjem statina dolazi do sniženja koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP), smanjena je aktivacija T-stanica, adhezija leukocita na endotel, te dolazi do smanjenja aktivacije jezgrenog čimbenika κ B (*engl. nuclear factor κ B*, NF- κ B) (4).

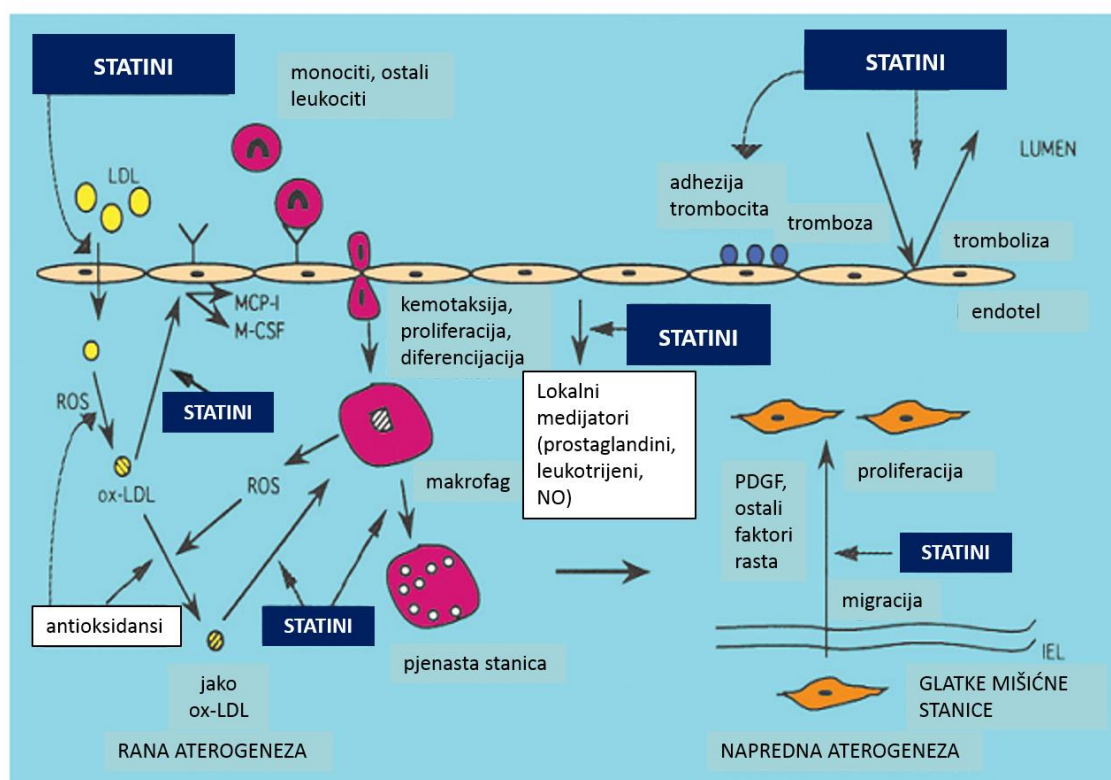
Mogući mehanizmi djelovanja statina uključuju interferenciju kod adhezije i proliferacije stanica, povećanu apoptozu pojedinih staničnih vrsta, te utječu vjerojatno i na oslobađanje citokina (5). Zatim utječu na funkciju endotela, čime povećavaju stabilnost aterosklerotskog plaka, smanjuju oksidacijski stres i upalnu reakciju, te inhibiraju trombogeni odgovor (19). Tablica 1. i Slika 2. prikazuju neke od pleiotropnih učinaka statina.

Tablica 1. Pleiotropni učinci statina

Djelovanje statina	Korist
Povećana sinteza NO	Poboljšanje endotelne funkcije
Inhibicija oslobađanja slobodnih radikala	
Smanjena sinteza ET-1	
Inhibicija oksidacije LDL-kolesterola	
Povećana regulacija progenitorske endotelne stanice	
Smanjenje broja i djelovanja upalnih stanica	Smanjenje upalnog odgovora
Smanjena koncentracija CRP-a	
Smanjena akumulacija kolesterola u makrofagima	Stabilizacija aterosklerotskog plaka
Smanjena sinteza MMP-ova	
Inhibicija adhezije i agregacije trombocita	Smanjenje trombogenog odgovora
Smanjena koncentracija fibrinogena	
Smanjenja viskoznosti krvi	

Tablica preuzeta iz (19).

NO - dušik-II-oksidi; ET-1 - endotelin-1; CRP - C-reaktivni protein; MMP - metaloproteinaza matriksa



Slika 2. Pleiotropni učinci statina. Slika preuzeta iz (20).

Hiperkolesterolemija pogoduje ulasku LDL-a u subendotelni prostor na mjestima sklonim lezijama u arterijama. Monocitni kemotaktički protein-1 (MCP-1) i oksidirani-LDL (ox-LDL) djeluju kao kemoatraktanti za izravnu akumulaciju monocita i njihovu migraciju u subendotelni prostor, gdje se monociti fenotipski transformiraju u makrofage. Istovremeno, slobodni radikali kisika modificiraju LDL. Ox-LDL ulazi u makrofage i nastaju "pjenaste stanice" (*engl. foam cells*). Pjenaste stanice razvijaju se u masne pruge, prekursore aterosklerotskih plakova. Statini pokazuju pleiotropno djelovanje u samom procesu aterogeneze koju prati hiperkolesterolemija, utječu na abnormalnosti koagulacije trombocita, abnormalnu funkciju endotela i determinante trombogenosti plaka kao što su upala plaka i proliferacija.

Ox-LDL – oksidirani lipoproteini niske gustoće; NO - dušik-II-oksidi; M-CSF – makrofagni stimulator rasta kolonije; MCP-1 - monocitni kemotaktički protein-1; PDGF – faktor rasta trombocita; ROS – reaktivni kisikovi spojevi

1.2 Citokini

Citokini su izvanstanične signalne molekule važne u staničnoj signalizaciji i međustaničnim interakcijama. Cohen i autori su 1974. godine prvi predložili riječ "citokini" za opis ovih molekula (21,22) koja potječe od kombinacije dviju grčkih riječi "cyto" - stanica i "kinos" - pokretljivost stanica (23).

Otkrića povezana s citokinima su započela još 1926. kada su Zinsser i Tamiya otkrili faktor permeabilnosti, a 1932. Rich i Lewis su otkrili da specijalni topljivi faktor uzrokuje migraciju neutrofila i makrofaga (23). Inicijalne studije od 1950. do 1970-ih godina su rezultirale otkrićima molekula proteinske građe koje posjeduju specifične funkcije kao što su interferon-gamma (IFN- γ) i makrofagni faktor aktivacije (21). 1970-ih godina, nekoliko citokina je pročišćeno i proizvedena su specifična antitijela na njih (21). Interleukini (IL) su tada otkriveni kao molekule koje sintetiziraju primarno leukociti i koje djeluju na leukocite. 1980-te godine se smatraju "zlatnim" vremenom u istraživanju citokina, jer su otkriveni mnogi citokini i proizvedena specifična monoklonalna antitijela na citokine (21). U 1990-tima nove tehnologije u genetici su dovele do razumijevanja biološke uloge citokina te do proizvodnje i dostupnosti rekombinativnih citokina za istraživanja u terapiji određenih bolesti (21). Daljnje studije su otkrivale i identificirale nove molekule citokina uključene u staničnu komunikaciju i do danas je poznato da se radi o vrlo heterogenoj skupini molekula i to više nego što se smatralo u početku (21).

Većina citokina ima molekulsku masu manju od 80 kDa. Citokini sudjeluju u nadzoru gotovo svake funkcije kod urođene i specifične imunosti (24). Do danas je poznato oko 200 citokina (25). Citokini posjeduju svojstvo pleotropizma, tj. jedan citokin posjeduje više funkcija (26,27). Posjeduju svojstvo redundancije tj. određena funkcija posredovana je s više citokina istovremeno (26,27). Pleotropizam i redundancija citokina na molekularnoj razini se mogu djelomično objasniti rasporedom i građom receptora za citokine (24). Ipak, djelovanje svakog pojedinog citokina je jedinstveno (24). Učinak citokina je posredovan vezanjem na visoko afinitetne stanične receptore, koji su prisutni najčešće u malom broju, ali pri aktivaciji stanice dolazi do povećanja broja receptora (26,27). Receptori mnogih citokina su grupirani u superporodice ovisno o prisutnosti homolognih regija (26,27). Sami citokini mogu potaknuti ekspresiju receptora koji mogu tada promijeniti odgovor i same stanice koja ih luči, kao i ciljne stanice na koju citokini djeluju (26,27). Citokine luče i sintetiziraju mnogobrojne stanice u organizmu, ali većinom upalne i imunosne

stanice kao što su: neutrofilni granulociti, makrofagi, T- i B-limfociti, endotelne stanice, fibroblasti i druge (24,26,27). Citokini djeluju na stanice u blizini njihova oslobađanja, te funkcioniraju pretežito na parakrini način (21,26,27). Citokini mogu djelovati i na udaljene stanice – endokrino, kao i na samu stanicu iz koje se oslobađaju – autokrino (21,26,27). Pojedini citokini sami stimuliraju svoju sintezu na autokrini način, dok drugi mogu stimulirati sintezu različitih citokina koji imaju povratan stimulacijski učinak na prvi citokin i time se pojačava njegov učinak (26,27).

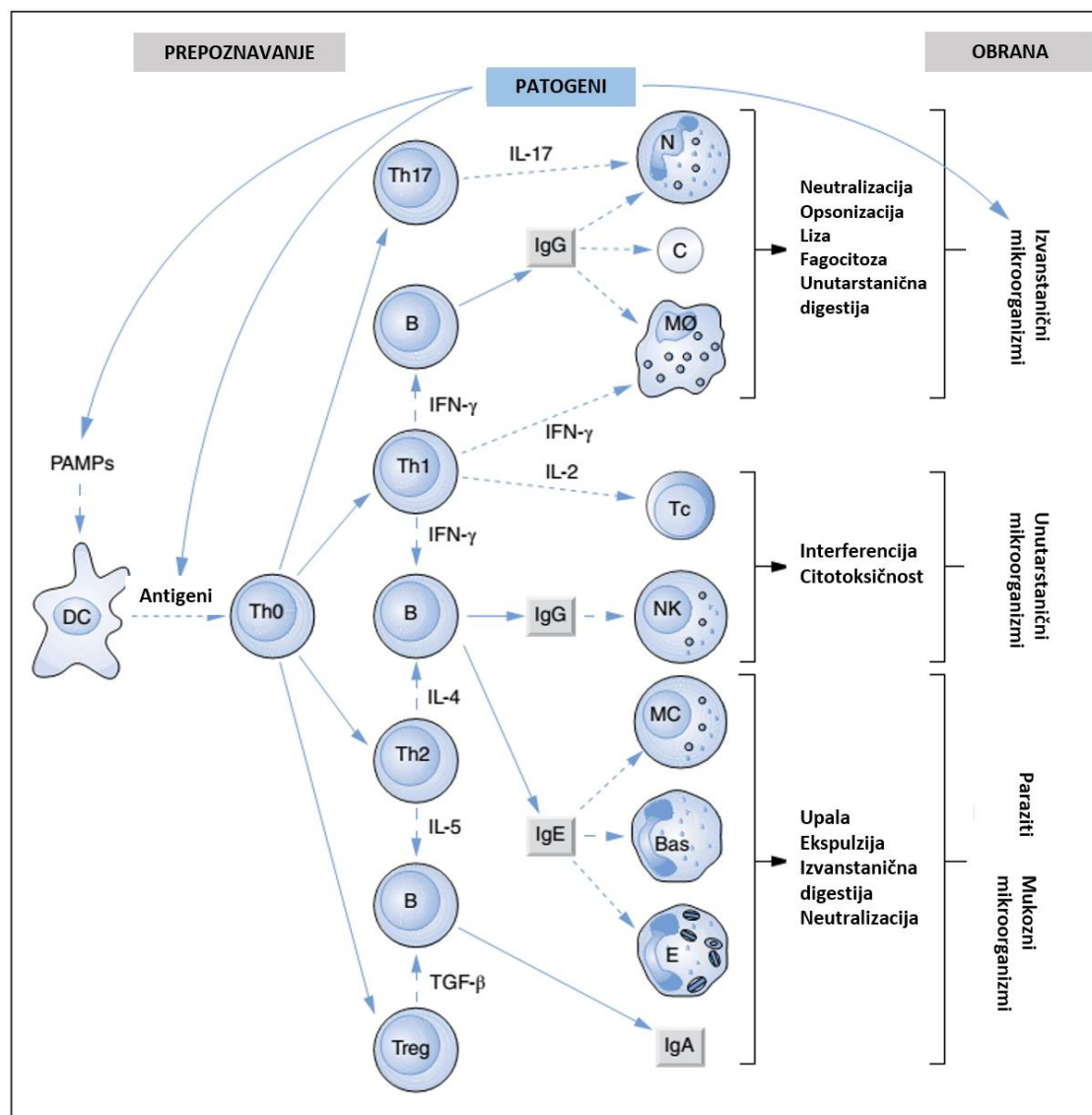
Aktivirani limfociti, poglavito CD4⁺ T-limfociti pri imunosnom odgovoru na specifične ili poliklonalne antigene luče određene citokine (26,27). Citokini koje luče CD4⁺ T-limfociti predstavljaju najvažniju klasu citokina koja je uključena u imunosni odgovor (26,27). Studije na miševima i kasnije na ljudskim CD4⁺ T-limfocitima otkrile su postojanje dvaju temeljnih funkcionalnih CD4⁺ stanica koje su nazvane T-pomagačke (*engl. T-helper, Th*) stanice – Th1 i Th2, koje se prepoznaju prema vrsti citokina kojeg luče (24), te dolazi do pokretanja i djelovanja različitih imunosnih mehanizama (26,27). Th1 stanice su karakterizirane dominantnom sekrecijom IL-2, IFN- γ i TNF- α , a glavna im je funkcija razvoj stanične imunosti, tj. aktivacija citotoksičnih limfocita i makrofaga (24,26–28). Th2 stanice proizvode dominantno IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 odgovorne pretežito za IgE i IgG4 proizvodnju antitijela te za aktivaciju mastocita i eozinofila (24,26–28). Citokini Th1 limfocita inhibiraju razvoj Th2 limfocita i obratno, a to osigurava razvoj imunosne reakcije u određenom smjeru (28).

Citokini uključuju i kemokine (prema *engl. chemoattractive cytokines*), koji imaju važne kemotaktične značajke (24,29). Kemokini sadrže u svojoj strukturi molekule cisteina, te se na temelju dvaju N-terminalnih cisteina kemokini grupiraju u četiri porodice: CXC, CC, (X)C i CX3C (30,31). U CXC kemokinu, jedna aminokiselina odvaja dva cisteina, dok su u CC-kemokinu dva cisteina jedan pored drugoga. Kemokini su niskomolekulski kemotaktični citokini od oko 8-10 kDa (32). Kemokini ispoljavaju svoje djelovanje vezanjem na specifične stanične površinske receptore (32).

Ostali citokini uključuju još i faktore rasta koji imaju važnu ulogu u proliferaciji, diferencijaciji i preživljenju stanica (24,29).

Prikazan je pregled imunosnog sustava i pokretanje imunosnih mehanizama, ovisno o oslobađanju određenih obrazaca citokina (Slika 3.). Citokini se najčešće ne oslobađaju pojedinačno nego se oslobađaju kao obrazac skupine citokina kod određenih bolesti. Potencijalni doprinos citokina u bolestima istraživao je s agonistima citokina, blokiranjem određenih učinaka citokina,

putem prekomjerne ekspresije i delecije citokina kod transgenskih miševa i u genetskim studijama (26,27).



Slika 3. Prikaz imunskog odgovora. Slika preuzeta iz (29).

Lijeva strana slike prikazuje prepoznavanje patogena koje se odvija putem molekularnih obrazaca povezanih s patogenom (*engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMP*) koji induciraju urođenu (nespecifičnu) imunost i kao antigeni koji pokreću adaptivnu (specifičnu) imunost. Antigen prezentirajuće stanice (*engl. antigen presenting cells, APC*), dendritične stanice stimuliraju nezrele T-pomagačke stanice (**Th0**). Dendritične stanice i druge stanice tkiva daju

"usmjerene signale" (određene prirodom patogena) koji upravljaju diferencijacijom T-stanica u određene podtipove – Th1, Th2, Th17, Treg (regulacijske T stanice) koje dalje luče različite citokine kao što su IFN- γ , IL-4, IL-17 i transformirajući faktor rasta β (*engl. transforming growth factor- β* , TGF- β). Ove T stanice tada reguliraju aktivnost određenih efektorskih stanica imunskog sustava, kao i sintezu B stanica, da sintetiziraju određenu klasu antitijela kao što su IgG, IgE ili IgA. Citokini koji potječu iz T-stanica igraju ključnu ulogu kako bi došlo do odgovarajućeg imunskog odgovora ovisno o prirodi patogena. Desna strana slike prikazuje obranu koja ovisi o određenoj kombinaciji efektorskih stanica i molekula koje su pokrenute opet ovisno o kategoriji patogena. Makrofagi i neutrofilni fagociti s komponentama komplementa i antitijelima, većinom imunoglobulinima G (IgG), dovode do efektorskih funkcija: fagocitoze i digestije ili lize izvanstaničnih mikroba (bakterija); stanice prirodne ubojice (*engl. natural killer*, NK) (bez ili s IgG antitijelima). Nadalje, citotoksične T stanice ubijaju inficirane stanice (inficirane virusom); mastociti, bazofili i eozinofili zajedno s IgE antitijelima uzrokuju ekspulziju ili digestiju mukoznih parazita, a IgA antitijela su prisutna na mukoznim površinama.

DC - dendritične stanice (*engl. dendritic cells*); MC - mastociti; IL - interleukin; Ig - imunoglobulin; IFN – interferon

1.2.1 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 β (IL-1 β) je upalni citokin koji je izrazito važan za obranu domaćina od infekcije i ozljede (33). IL-1 β je član porodice citokina IL-1 i jedan je od najbolje istraženih citokina u toj porodici (33), molekulske mase od oko 17 kDa (21,24). Porodica IL-1 uključuje 7 liganada s aktivnosti agonista: IL-1 α i IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , β , γ ; tri receptora antagonista: IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38 i protu-upalni citokin IL-37 (34).

IL-1 α i IL-1 β kodiraju različiti geni, ali se vežu na isti receptor IL-1R1 (34). Razlike koje postoje između IL-1 α i IL-1 β vezane su uz stanice koje ih luče i mehanizam njihovog oslobađanja, te posjeduju slične biološke značajke (34). IL-1 α i IL-1 β su centralni medijatori kod urođene imunosti i upale (34). Učinci IL-1 α i IL-1 β na središnji živčani sustav (SŽS) uključuju vrućicu i aktivaciju osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (*engl. hypothalamus-pituitary-adrenal*, HPA) (34). Pri povišenoj temperaturi povećana je migracija leukocita (34). Uslijed aktivacije osi

HPA, kortizol iz nadbubrežne žlijezde ima regulacijsku funkciju na urođenu imunost i upalu (34). Značajka reakcije akutne faze, pokrenute s IL-6, u jetri, je i amplifikacija urođene otpornosti posredovane putem humoralnog kraka urođene imunosti (oslobađa se CRP, lektin koji veže manozu, komponente komplementa) te se regulira oštećenje tkiva (α 1-antitripsin) (34). Indukcijom adhezijskih molekula u endotelnim stanicama i s kemokinima dolazi do amplifikacije regrutacije leukocita i urođene otpornosti na infekciju. IL-1 α i IL-1 β produžuju životni vijek i stimuliraju efektorske funkcije neutrofila i makrofaga (34).

IL-1 β sintetizira se i secernira iz hematopoetskih stanica kao što su monociti u cirkulaciji, dendritične stanice kože i mikroglija stanice mozga kao odgovor na T-limfocitni receptor (TLR), aktivirane komponente komplementa i druge citokine kao što su TNF- α i sam IL-1 (34). Prekursor IL-1 β se kida kaspazom-1, te se oslobađa aktivni citokin koji se izlučuje u izvanstanični prostor (34). IL-1 α se nalazi u jezgri stanica i funkcionira kao transkripcijski faktor, dok IL-1 β nije nađen u jezgri stanice (34). IL-1 α i IL-1 β imaju različitu ulogu u upali i karcinogenezi (34).

IL-1 β je jedan od ključnih citokina koji pokreće neutrofilnu upalu u dišnim putovima kod KOPB-a (35). IL-1 β inducira IL-6 i IL-8 u normalnim humanim bronhijalnim epitelnim stanicama, te dolazi do nakupljanja i aktivacije neutrofila u dišnim putovima (35). Nadalje, posreduje u povećanju broja T-limfocita i dendritičnih stanica u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) i tkivu pluća kod animalnog, *in vitro*, modela plućne upale uzrokovane duhanskim dimom. Ovi tipovi stanica dalje utječu na oslobađanje IL-6 i IL-17, što povećava dolazak neutrofila na mjesto upale u dišnim putovima (35,36).

1.2.2 Interleukin-2 (IL-2)

Interleukin-2 (IL-2) ima imunostimulacijsku i imunoregulacijsku funkciju (24,37). Interleukin-2 (IL-2) i njegov receptor IL-2R su među prvima otkriveni i klonirani te se proučavaju već preko 20 godina (37). IL-2 posjeduje molekulsku masu od oko 25 kDa (24,37). Prva otkrivena funkcija IL-2 je bila *in vitro* stimulacija proliferacije i diferencijacije T-stanica, te se tada nazivao i hormonom rasta T-limfocita (*engl. T-cell growth factor*, TCGF) (37). IL-2 utječe na homeostazu regulacijskih T stanica (Treg) koje imaju ulogu u održavanju tolerancije na vlastite antigene, utječe na aktivaciju inducirane stanične smrti, na diferencijaciju T-stanica, razvoj proliferacijski kompetentne memorije, učinkovito uklanjanje CD8⁺ (citotoksičnih) T-stanica s neinfektivnim

imunogenima, na efektorske T stanice u ne-limfatičnim tkivima i na održavanje T stanica tijekom kronične infekcije (37). IL-2 sudjeluje u aktivaciji stanica, ali može utjecati i na smanjenje imunosnog odgovora (37). Utječe na rast i proliferaciju različitih stanica imunosnog sustava kao što su NK i T stanice (38). Može se primjeniti u imunoterapiji kod tumora (37). IL-2 se pokazao klinički koristan u terapiji karcinoma bubrežnih stanica i melanoma. Ipak terapijska primjena mu je ograničena zbog toksičnosti koju izaziva pri sistemske primjeni. U tijeku su istraživanja za lokalnu primjenu IL-2 u obliku aerosola, kao dodatna terapija kod osteosarkoma s metastazama u plućima (38).

1.2.3 Interleukin-4 (IL-4)

Interleukin-4 (IL-4) je multifunkcionalni pleotropni citokin otkriven sredinom 1980-tih godina, molekulske mase oko 12-20 kDa (24,39,40). Jedna od najvažnijih značajki IL-4 je njegova uloga u diferencijaciji Th0 limfocita u Th2 fenotip limfocita (39,41). IL-4 dijeli sekvencijsku homologiju, receptore na površini stanica, unutarstaničnu signalizaciju i djelomično funkcionalni učinak s IL-13 (39). Primarno se sintetizira u aktiviranim T stanicama, ali i u mastocitima, bazofilima i eozinofilima (39,42). IL-4 definira i regulira proliferaciju stanica, apoptozu i ekspresiju brojnih gena u različitim stanicama kao što su limfociti, makrofagi, fibroblasti, epitelne i endotelne stanice (39).

IL-4 i IL-13 imaju ulogu u atopiji i alergijskim bolestima (41). Smatra se da sudjeluju u patofiziologiji astme kod proliferacije bronhijalnih fibroblasta, miofibroblasta, i glatkih mišićnih stanica u dišnim putovima te dolazi do remodeliranja dišnih putova (41). IL-4 sintetiziran u T-limfocitima, aktiviranim mastocitima i bazofilima ima ulogu u astmi jer sudjeluje u sintezi IgE, kemotaksiji eozinofila i definira Th2 fenotip limfocita (41). IL-4 ima također i ulogu u sintezi IL-5 (41). Smatra se, da bi blokiranje IL-4 moglo omogućiti kontrolu Th2 upale i smanjenje plućne eozinofilije posredovane putem IL-5 (41). Klinička ispitivanja kod astme za anti-IL-4 biološke lijekove pitakinra i dupilumab su pokazala smanjenu učestalost egzacerbacija te utjecaj na FEV₁ (41).

1.2.4 Interleukin-5 (IL-5)

IL-5 ima pleiotropne učinke na različite stanice i kontrolira stvaranje i funkciju mijeloidnih i limfoidnih stanica, molekulske je mase od oko 30-60 kDa (24,43). IL-5 se sintetizira u hematopoetskim i ne-hematopoetskim stanicama kao što su Th2-stanice, mast stanice, eozinofili, NK-stanice, granulociti (43). IL-5 je citokin koji djeluje na sazrijevanje i aktivaciju eozinofila, utječe na diferencijaciju B-stanica, na prekapčanje klase imunoglobulina IgH (teški lanci, *engl. heavy chains*) i na sintezu IgA u mukozu (43). IL-5 je povezan s Th2 imunosnim odgovorom (43). Tijekom upalne reakcije sudjeluje u stvaranju eozinofila, hiperreaktivnosti dišnih putova i remodeliranju tkiva (43).

Eozinofili i ključni citokin IL-5 koji utječe na eozinofile, su uključeni u patogenezu astme kod većine bolesnika, ali isto tako eozinofili su prisutni u povećanom broju i kod nekih bolesnika s KOPB-om (44). Za terapiju astme su tako odobreni od FDA anti-IL-5 lijekovi: mepolizumab, reslizumab i benralizumab. U tijeku su i klinička ispitivanja kod KOPB-a s anti-IL-5 jer se smatra da bi to mogla biti učinkovita dodatna terapija za bolesnike s eozinofilnim fenotipom i učestalim egzacerbacijama KOPB-a (44).

1.2.5 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 je upalni citokin koji inducira upalnu signalizaciju i odgovor na infekciju te regulira metaboličke i regeneracijske procese u stanici, ali posjeduje i protu-upalne učinke (45). IL-6 je glikoprotein molekulske mase 21-28 kDa (45). U klasičnoj signalizaciji, IL-6 stimulira ciljnu stanicu preko receptora za IL-6 (IL-6R) na staničnoj membrani, koji se nakon vezanja liganda povezuje sa signalnim receptorom proteinom gp130 (45). Gp130 dimerizira i dolazi do aktivacije Janus kinaza i posljedične fosforilacije tirozinskih ostataka u citoplazmatskom dijelu gp130, te dalje dolazi do aktivacije puta Ras/Raf/protein kinaze aktivirane mitogenom (*engl. mitogen-activated protein kinase, MAPK*) (45). Aktiviraju se transkripcijski faktori i dolazi do aktivacije ciljnih gena (45). Osim te klasične signalizacije preko IL-6R, sve stanice se mogu stimulirati preko topljivog IL-6R, tzv. trans-signalizacijom, jer se gp130 eksprimira ubikvitarno (45).

IL-6 je pleiotropni citokin koji inducira sintezu proteina akutne faze kao što su CRP, serumski amiloid A (SAA), fibrinogen i hepcidin u hepatocitima dok inhibira sintezu albumina

(46). Ima važnu ulogu u stečenom imunosnom odgovoru jer stimulira proizvodnju antitijela i razvoj efektorskih T stanica (46). IL-6 utječe i na diferencijaciju ili proliferaciju mnogih ne-imunosnih stanica (46). Zbog pleiotropnog učinka IL-6, neregulirana kontinuirana sinteza IL-6 dovodi do razvoja različitih oboljenja te je IL-6 povezan s mnogim upalnim bolestima: reumatoidnim artritisom (RA), anemijom kronične bolesti, angiogenezom i mnogim tumorima (46,47). Stoga je i razvijeno humano antitijelo na anti-IL-6 receptor pod nazivom tocilizumab koje je odobreno za upotrebu u terapiji RA i juvenilnog idiopatskog artritisa (46). Korist od upotrebe tocilizumaba se razmatra u još nekim oboljenjima te su u tijeku klinička ispitivanja (46).

1.2.6 Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 (IL-8 ili CXCL8) je identificiran 1987. godine kao novi tip citokina koji aktivira i privlači neutrofilne granulocite (48). IL-8 spada u skupinu kemokina i tipični je predstavnik kemokina CXC porodice (32). IL-8 se luči u izvanstanični prostor pod utjecajem različitih staničnih stimulansa (32,48). Transkripcijom gena za IL-8 nastaje protein od 99 aminokiselina te proteolitičkim kidanjem nastaje biološki aktivan oblik od 77 aminokiselina u ne-imunosnim stanicama, a od 72 aminokiseline u monocitima i makrofagima (32,48). IL-8 ispoljava svoje djelovanje vezanjem na specifične receptore na površini stanica CXCR1 ili CXCR2 receptor (32). Većina stanica s jezgrom luči IL-8 (32). IL-8 je otporan na temperaturu, proteolizu i djelomično kiseli mikrookoliš, rano se luči u upalnom odgovoru i ostaje aktivan produljeni period što ga čini dobrim biomarkerom za akutne upale (32).

IL-8 se smatra upalnim medijatorom te je predložen kao biomarker u različitim kliničkim stanjima kao što su: kronični prostatitis, akutni pijelonefritis, tumor mokraćnog mjehura, osteomijelitis, plućne infekcije i dr. (49).

Kemokini imaju važnu ulogu u migraciji upalnih stanica u pluća iz cirkulacije u bolesnika s KOPB-om (50). U bolesnika s KOPB-om u uzorcima sputuma nađene su povećane koncentracije CXCL1 i IL-8 te korelacija s brojem neutrofila (50). Pinto-Plata i sur. su mjerili IL-8 u bolesnika s KOPB-om te su pokazali da IL-8 ne korelira sa stupnjem GOLD-a (I-IV), za razliku od IL-6 i TNF- α (51).

1.2.7 Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin-10 (IL-10) je snažni protuupalni citokin, primarno nazvan inhibicijski faktor sinteze citokina (*engl. cytokine synthesis inhibitory factor*, CSIF), zbog svoje sposobnosti da inhibira sintezu upalnih citokina (52). Molekulska masa IL-10 je oko 18 kDa. IL-10 se sintetizira u većini leukocita, T i B stanicama, dendritičnim stanicama, NK stanicama, mastocitima i keratinocitima (52). IL-10 ima kratak poluvijek života, kao i kratak raspon djelovanja. Sinteza IL-10 u različitim tipovima stanica je možda odraz potrebe osiguranja brze dostupnosti IL-10 na različitim lokacijama (52). IL-10 djeluje putem specifičnih staničnih površinskih receptora (IL-10R), koji se sastoji od dva lanca IL-10R1 i IL-10R2 (52). IL-10 ima mnogo bioloških funkcija kojima je cilj održavanje homeostaze imunskih reakcija, inhibicija APC-a, smanjenje ekspresije MHC klase II, smanjenje ekspresije CD80 (T-stanični kostimulator), inhibicija sinteze citokina u Th1 i Th2 limfocitima, IL-1 β , kemokina, MMP-ova te inhibicija sinteze IgE i aktivacije eozinofila (50,52,53). IL-10 također posjeduje i specijalne uloge, npr. Treg koriste IL-10 za potiskivanje upale i autoimunosti (52).

1.2.8 Interleukin-12 p70 (IL-12p70)

Interleukin-12 (IL-12) je citokin koji se sintetizira uglavnom u mijeloidnim stanicama, dendritičnim stanicama i makrofagima, kao odgovor na infektivne uzročnike i druga oštećenja (54). Spada u porodicu citokina IL-12 uz IL-15, IL-23 i IL-27 (55). IL-12 ima molekulsku masu od 24-70 kDa, ovisno o molekularnom obliku (21). IL-12 potiče stvaranje Th1 stanica, koje sintetiziraju IFN- γ prilikom aktivacije CD4⁺ T-stanica. IL-12 iz makrofaga utječe na sintezu IFN- γ u NK-stanicama tijekom infekcije unutarstaničnim parazitima te doprinosi zaštiti tijekom akutne infekcije (56,57). Ovi pronalasci su otkrili postojanje osi citokina u kojima mijeloidne stanice koje stvaraju IL-12 potiču proizvodnju IFN- γ u limfoidnim stanicama i doprinose rezistenciji na infekciju (56,57).

1.2.9 Interferon- γ (IFN- γ)

Interferoni (IFN) su primarno otkriveni kao agensi koji interferiraju s replikacijom virusa (58). U početku su se klasificirali ovisno o stanicama koje ih izlučuju, međutim danas se klasificiraju u tip I i tip II prema specifičnosti receptora i sekvencijskoj homologiji (58). Tip I IFN se sastoje od podtipova multiplih IFN- α (14-20, ovisno o vrsti), IFN- β , IFN- ω i IFN- τ , svi su strukturno slični i vežu se na isti zajednički heterodimerni receptor. Većina stanica sintetizira IFN I u malim količinama, ali hematopoetske stanice sintetiziraju najviše IFN- α i IFN- ω , a fibroblasti IFN- β (58).

IFN- γ je jedini predstavnik tipa II IFN, strukturno je različit od IFN I, veže se na drugi receptor i kodira se na drugom kromosomskom lokusu (58). Molekulska masa mu je oko 20-70 kDa (21,24). IFN- γ se stvara u CD4⁺ Th limfocitima (Th), CD8⁺ T-limfocitima, NK stanicama, B-stanicama i APC stanicama. Sintezu IFN- γ nadziru citokini IL-12 i IL-18 koje stvaraju APC-ovi (58). Negativni regulatori sinteze IFN- γ su: IL-4 i IL-10, TGF- β i glukokortikodi (58).

IFN- γ je citokin koji ima različite funkcije u stanicama jer kontrolira transkripciju imunosno relevantnih gena (58). Utječe na privlačenje leukocita, rast, sazrijevanje i diferencijaciju mnogih stanica, na aktivnost NK stanica i makrofaga, na regulaciju funkcije B-limfocita za proizvodnju imunoglobulina. IFN- γ sudjeluje u regulaciji procesa prepoznavanja patogena, u procesiranju i prezentaciji antigena, inhibiciji proliferacije stanica, ima učinak na proces apoptoze, aktiviranje efektorskih mikrobicidnih učinaka, imunomodulaciju i migraciju leukocita (58). Sudjeluje u signalizaciji i odgovoru na patogen zajedno s drugim citokinima, kao što su TNF- α , IL-4, tip I IFN i lipopolisaharidi (58).

1.2.10 Čimbenik tumorske nekroze- α (TNF- α)

Čimbenik tumorske nekroze (*engl. tumor necrosis factor*, TNF) je otkriven 1975. godine kao molekula koju oslobađaju stanice domaćina pod utjecajem endotoksina, te uzrokuje nekrozu tumora *in vitro* (59). TNF je i dobio ime po svojem djelovanju na nekrozu tumora, *in vivo* i *in vitro* (60). Tijekom kliničkih ispitivanja TNF je pokazao brojne nuspojave, kao zimice, tresavice, tahikardiju, hipertenziju, mučninu i druge, te je nada da je TNF lijek za tumore napuštena (60–62). Ipak, potencijal za blokiranje djelovanja TNF-a u upalnim bolestima, zbog dugog poluživota i *in*

vivo sigurne primjene imunoglobulina (Ig), je sugerirao da bi upotreba anti-TNF antitijela poboljšala upalno stanje u kojem posreduje TNF (60). Trenutno su u svijetu dostupni lijekovi koji se temelje na blokiranju TNF- α kao što su etanercept, infliximab, adalimumab i drugi kao terapija za neke bolesti kao što su reumatoidni artritis (RA), ankilozantni spondilitis, Crohnova bolest, ulcerozni kolitis i psorijaza (60).

TNF se danas smatra citokinom koji ima najširi raspon pleiotropnog djelovanja od svih citokina, a djelovanje TNF-a je prisutno u svim biološkim sustavima od imunskog do središnjeg živčanog sustava (60). TNF je transmembranski protein od 26 kDa koji se eksprimira u gotovo svim aktiviranim monocitima/makrofagima, NK i T-stanicama, ali i stanicama koje nisu dio imunskog sustava kao što su endotelne stanice i fibroblasti (60,63,64). TNF stimulira transkripcijski faktor NF- κ B te posljedično dolazi do indukcije arahidonske kiseline, leukotrijena (LT), prostaglandina (PG) i to objašnjava učinke TNF-a na različite stanice (60). Uz to, TNF u imunskim stanicama potiče kaskadu djelovanja citokina i kemokina (60). TNF utječe na diferencijaciju monocita/makrofaga, potiče aktivaciju proliferacije B-limfocita i fibroblasta, na autokrino povećanje ekspresije receptora za TNF, te inducira upalu i često djeluje zajedno s IL-1 β (60). Ovisno o vrsti stanice u kojoj se sintetizira ili na koju djeluje, TNF, s ili bez IL-1 β snažno inducira IL-6 i sam TNF (60). Do porasta koncentracije IL-6 u cirkulaciji čovjeka dolazi pod utjecajem TNF-a ili tijekom bakterijske infekcije. Zajedno su ovi citokini centralni medijatori endotoksičnog šoka koji se fiziološki regulira preko sinteze topljivog antagonista receptora za IL-1 i/ili topljivog TNF-receptora (60).

1.2.11 Čimbenik tumorske nekroze- β (TNF- β)

Čimbenik tumorske nekroze- β (TNF- β) ili limfotoksin- α (LT- α) ima sličnu biološku aktivnost kao i TNF- α (65). Prvi put je opisan 1968. godine kao citotoksični čimbenik kojeg proizvode T-limfociti nakon stimulacije antigenom ili mitogenom (66). Uzrokuje direktnu citolizu tumorskih stanica *in vitro* i posjeduje protuproliferativnu aktivnost na tumorske stanične linije, kao i TNF- α (65). TNF- β pokazuje 30 % homologiju u primarnom slijedu aminokiselina s TNF- α , kao i sličnost u terciarnoj i kvarternoj strukturi. TNF- β je topljivi homotrimer koji se sastoji od 17 kDa monomera i veže se na TNF receptore 1 i 2 (TNFR1 i TNFR2) kako bi ispoljio svoju biološku aktivnost (66). TNF- β se eksprimira u CD4⁺ Th1 stanicama, CD8⁺ stanicama, NK stanicama, B

stanicama i makrofagima (66). LT- α ima specifičnu ulogu u razvoju i funkciji imunološkog sustava, poglavito u razvoju limfoidnih organa, organizaciji i održavanju limfoidnog mikrookoliša, zaštiti domaćina i upali (66). Ipak, većina ovih istraživanja je provedena na genetski deficijentnim miševima i uloga TNF- β kod ljudi nije do kraja razjašnjena (66).

1.3 Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB)

1.3.1 Definicija kronične opstruktivske plućne bolesti

Definicija kronične opstruktivske plućne bolesti (KOPB), prema Globalnoj strategiji za dijagnosticiranje, liječenje i prevenciju KOPB-a (*engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, GOLD*) je:

"KOPB učestala je bolest koja se može spriječiti i liječiti, a karakterizirana je trajnim progresivnim smanjenjem protoka zraka kroz dišne putove i povezana je s kroničnim upalnim odgovorom u dišnim putovima i plućima na štetne čestice ili plinove. Egzacerbacije i komorbiditeti doprinose ukupnoj težini kliničke slike u pojedinim bolesnika" (7).

Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization, WHO*) predviđa da će do 2030. godine KOPB postati treća bolest po mortalitetu u svijetu (67). Prema zadnjim podacima WHO-a tijekom 2016. godine prevalencija KOPB-a u svijetu je iznosila 251 milijuna slučajeva (67). KOPB je globalno uzrokovao 3,17 milijuna smrti u 2015. godini, što čini ukupno 5 % smrtnih slučajeva tijekom te godine (67). Najčešći rizični čimbenici za KOPB su duhanski dim (oko 80 % oboljelih), a kao uzročni čimbenici se navode još i zagađenje zraka, loša prehrana, profesionalni rizik, uz vanjsko i unutarnje zagađenje zraka nastalo sagorijevanjem dizelskog goriva, kao i genski rizični čimbenici od kojih je najbolje opisana deficijencija α_1 -antitripsina (7,68). Klinička dijagnoza KOPB-a se postavlja spirometrijskim tehnikama što je "zlatni standard" za dijagnozu KOPB-a kao i za praćenje bolesti (7,69). Spirometriju je potrebno napraviti u bolesnika s kroničnim kašljem i iskašljavanjem, osobito ako se radi o pušaču, čak i bez tegoba (7,69). Kod KOPB-a smanjene su vrijednosti forsiranog izdisajnog volumena u 1 sekundi (FEV_1) i forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC) (7,69). Nalazi post-bronhodilatacijskog testa $FEV_1 < 80 \%$ i $FEV_1/FVC < 70 \%$ potvrđuju prisutnost smanjenja protoka zraka i time dijagnozu KOPB-a (7,69). Klinička dijagnoza KOPB-a se razmatra kod svakog bolesnika sa simptomima dispneje, kroničnog kašlja ili kod povećanog stvaranja sputuma, te ako bolesnik ima u anamnezi pušenje ili neki drugi rizični čimbenik za KOPB (7,69). Dispneja ili zaduha je neugodan subjektivni osjećaj poteškoće u disanju, a najčešća je u fizičkom naporu (7,69). Procjena bolesnika s KOPB-om se temelji na simptomima, riziku egzacerbacija, spirometrijskim pokazateljima i na identifikaciji komorbiditeta (7,69). Procjena bolesnika je nužna zbog određivanja težine bolesti i terapije te zbog rizika za razvoj budućih događaja (egzacerbacije, primitak u bolnicu, smrt). Upitnici kao što su KOPB

upitnik (*engl. COPD Assesment test*, CAT) ili klinički KOPB upitnik (*engl. Clinical COPD Questionnaire*, CCQ) se preporučuju za procjenu simptoma. Modificirana skala britanskog Medicinskog istraživačkog vijeća, mMRC (*engl. British Medical Research Council*, mMRC) pruža procjenu za kratkoću daha (7,70).

Egzacerbacija u KOPB-u je akutni događaj karakteriziran pogoršanjem respiracijskih simptoma koji su izvan uobičajenih normalnih dnevnih varijacija i zahtijevaju promjenu u liječenju (7,69). Bolesnici s KOPB-om često imaju i druge bolesti (komorbiditete) koje imaju značajan utjecaj na prognozu bolesti (7,69).

Terapija koja se u današnje vrijeme koristi za KOPB ne spriječava daljnji razvoj bolesti niti zaustavlja upalni proces u KOPB-u. Prestanak pušenja najučinkovitija je mjera u cilju smanjenja rizika za nastanak i usporenja progresije KOPB-a, međutim dugoročno mnogi bolesnici opet počnu pušiti (68,71).

Farmakološka terapija za KOPB se koristi za smanjenje simptoma bolesti, smanjenje učestalosti i težine egzacerbacija, poboljšanje zdravstvenog statusa i bolju toleranciju na fizičku aktivnost (7). Bronhodilatori su temelj za terapiju simptoma kod KOPB-a (7). Koristi se terapija za inhaliranje, te β_2 -agonisti, antikolinergici, teofilin ili kombinacije koje ovise o simptomima bolesnika. Bronhodilatori s produženim djelovanjem smanjuju egzacerbacije, simptome i bolničko liječenje (7). Tiotropijum poboljšava plućnu rehabilitaciju (7). Inhalacijski kortikosteroidi (*engl. inhalation corticosteroids*, ICS) se koriste u bolesnika s $FEV_1 < 60\%$ predviđenog, te se smanjuju simptomi bolesti i poboljšava se funkcija pluća, smanjena je učestalost egzacerbacija i bolja je kvaliteta života (7). Također se daje i kombinacija terapije ICS-a i bronhodilatatora. Oralni kortikosteroidi se ne preporučuju. Inhibitori fosfodiesteraze-4, kao što je roflumilast, smanjuju učestalost egzacerbacija u bolesnika s KOPB-om u stadijima GOLD 3 i GOLD 4 (7).

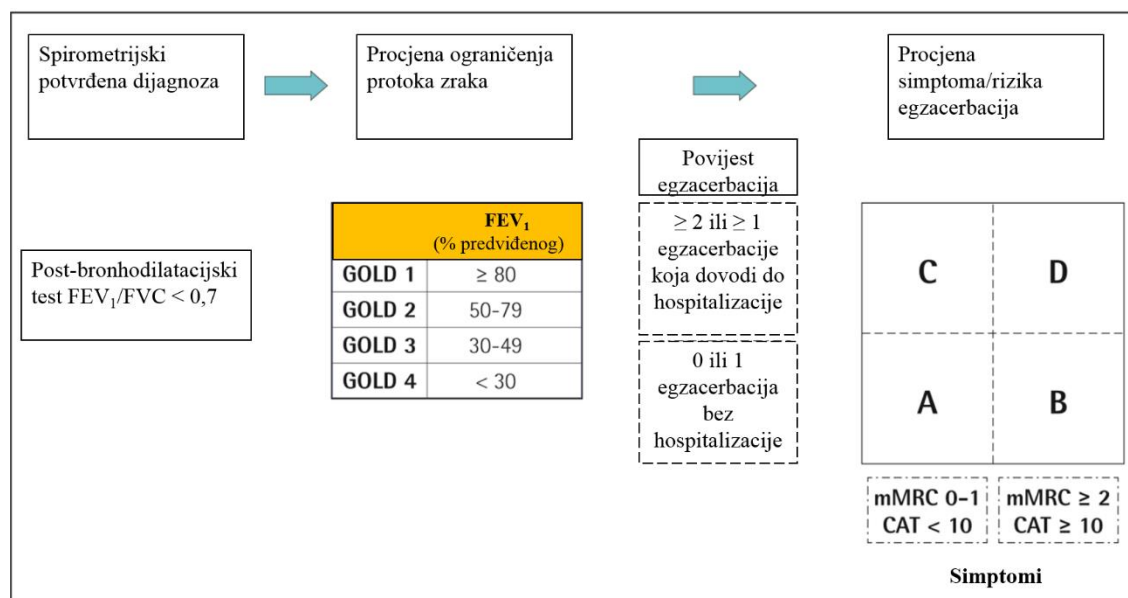
Tablica 2. prikazuje klasifikaciju bolesnika s KOPB-om temeljenu na spirometrijskim pokazateljima, odnosno po stupnju težine ograničenja protoka zraka (7).

Tablica 2. Klasifikacija težine KOPB-a temeljena na spirometrijskim pokazateljima, na temelju FEV_1 nakon primjene bronhodilatatora, u bolesnika s $FEV_1/FVC < 0,70$. Tablica preuzeta iz (7).

GOLD 1	Blaga	$FEV_1 \geq 80\%$ predviđenog
GOLD 2	Umjerena	$50\% \leq FEV_1 < 80\%$ predviđenog
GOLD 3	Teška	$30\% \leq FEV_1 < 50\%$ predviđenog
GOLD 4	Jako teška	$FEV_1 < 30\%$ predviđenog

FEV_1 - forsirani izdisajni volumen u 1 sekundi; GOLD - Globalna strategija za dijagnosticiranje, liječenje i prevenciju KOPB-a (*engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, GOLD*)

Slika 4. prikazuje redefiniranu procjenu bolesnika po ABCD klasifikaciji (7). U obzir se uzimaju spirometrijski pokazatelji, procjena dispneje po mMRC skali ili simptoma po CAT-u i učestalost egzacerbacija tijekom zadnje godine (7). Ova klasifikacija doprinosi odluci o individualnoj terapiji za bolesnika npr. da li treba smanjiti učestalost egzacerbacija ili simptome u bolesnika (7).



Slika 4. Redefinirana procjena bolesnika po ABCD klasifikaciji. Slika preuzeta iz (7).

FEV_1 - forsirani izdisajni volumen u 1 sekundi; FVC- forsirani vitalni kapacitet; mMRC- modificirana skala britanskog Medicinskog istraživačkog vijeća (engl. *British Medical Research Council*, mMRC); CAT- KOPB upitnik

1.3.2 Patogeneza i patofiziologija kronične opstruktivske plućne bolesti

KOPB je karakterizirana progresivnom opstrukcijom dišnih putova koja nije potpuno reverzibilna, a uzrokovana je neprimjerenim upalnim odgovorom na dugotrajnu izloženost štetnim tvarima, posebno duhanskom dimu (7). Najznačajniji mehanizmi u patogenezi KOPB-a su kronična upala, oksidacijski stres i neravnoteža proteaza i antiproteaza (72–74).

KOPB je kompleksna upalna bolest u kojoj dolazi do porasta broja upalnih stanica: makrofaga, T-limfocita, B-limfocita i neutrofila u alveolama, malim dišnim putovima i plućima (75). Opseg upale je povezan sa stupnjem prisutne opstrukcije (75). Međusobni odnos ovih upalnih stanica i vrijeme njihova pojavljivanja je za sada još prilično nepoznato (75). Upalne i neke strukturne stanice otpuštaju upalne medijatore koji sudjeluju u patofiziološkom procesu KOPB-a (75). Identifikacija upalnih medijatora i njihovo otpuštanje iz upalnih i strukturnih stanica te njihove međusobne interakcije su važne za razumijevanje patofiziologije KOPB-a kao i za razvoj moguće terapije (75). Upalni medijatori koji su do sada istraživani i sudjeluju vjerojatno u procesu razvoja bolesti su lipidni medijatori (prostanoidi, leukotrijeni (LT), faktor aktivacije trombocita), ROS, NO, peptidni medijatori (endotelini, bradikinin, tahikini), kemokini, citokini, faktori rasta i proteaze (76). U KOPB-u makrofagi dišnih putova aktivirani s ekstraktom duhanskog dima secerniraju upalne proteine koji sudjeluju u upalnoj reakciji. Neutrofilne granulocite privlači IL-8, onkogen- α povezan s rastom (*engl. growth-related oncogene- α , GRO- α*) i LT-B₄ (LTB₄), monocite privlači kemotaktički protein-1 za makrofage (MCP-1), limfocite protein induciran interferonom- γ (IP-10), monokin induciran interferonom- γ (Mig) i T-stanični α -kemoatraktant induciran interferonom (I-TAC). Oslobađaju se enzimi kao što su MMP-ovi i katepsini koji uzrokuju elastolizu (gubitak elastičnosti) pluća te konačno doprinose stvaranju emfizema (76). Fibrozi plućnoga tkiva doprinose TGF- β i faktor rasta vezivnog tkiva (*engl. connective tissue growth factor, CTGF*) (76). Makrofagi također stvaraju ROS i NO koji zajedno doprinose stvaranju peroksinitrita te doprinose rezistenciji na steroide koji se primjenjuju u terapiji kod KOPB-a (76).

Patološke promjene u KOPB-u naposljetku uzrokuju hipersekreciju mukusa, disfunkciju cilija, opstrukciju dišnih putova, abnormalnosti u izmjenama plinova, plućnu hipertenziju te su prisutni i sistemski učinci (72,73,77). Hipersekrecija sluzi i disfunkcija cilija dovodi do produktivnog kroničnog kašlja što je karakteristično za kronični bronhitis. Međutim, nije nužno prisutna opstrukcija dišnih putova jer nemaju svi bolesnici s KOPB-om hipersekreciju mukusa.

Ograničenje protoka zraka u izdisaju glavni je znak patofiziološke promjene u KOPB-u, koja je uzrokovana fiksnom opstrukcijom dišnih putova i povećanjem plućne rezistencije. Abnormalna izmjena plinova u uznapredovalom stadiju KOPB-a je karakterizirana hipoksemijom s ili bez hiperkapnije. Poremećaj distribucije odnosa ventilacije i perfuzije, koji se javlja zbog anatomskih promjena u KOPB-u je glavni uzrok abnormalne izmjene plinova. Plućna hipertenzija se razvija kasno u KOPB-u, čemu doprinosi plućna arterijska konstrikcija zbog hipoksemije, disfunkcija endotela, remodeliranje plućne arterije i destrukcija plućnih kapilara. Strukturne promjene u plućnim arteriolama dovode do plućne hipertenzije i hipertrofije desnog ventrikula ili disfunkcije te razvoja plućnog srca (69,73).

Kronična upala koja je prisutna u dišnim putovima, plućnom parenhimu i krvnim žilama (plućnim arterijama) posjeduje i sistemske učinke. Dolazi do sužavanja malih dišnih putova, do fibroze perifernih dišnih putova, hipertrofije glatke muskulature i vrčastih stanica kao i do hipersekrecije sluzi. U parenhimu pluća dolazi do destrukcije međualveolarnih pregrada, smanjenja elasticiteta pluća te nastaje emfizem (76,78).

Neutrofilni granulociti

Neutrofilni granulociti (neutrofili) su stanice koje predstavljaju prvu liniju obrane u imunosnom sustavu te otpuštaju ROS, upalne citokine, lipidne medijatore, antibakterijske peptide i enzime koji oštećuju tkivo (79). Neutrofili sudjeluju u stvaranju mukozne metaplazije te u destrukciji plućnog tkiva kod emfizema (79). Inhalacija duhanskog dima dovodi do povećanja broja neutrofila u submukozi i epitelu dišnih putova, iako su neutrofili predominantno prisutni u lumenu dišnih putova (77). Neutrofili i CD8⁺ limfociti u bolesnika s KOPB-om su povećani u sputumu i BAL-u (80,81). Napredovanjem bolesti, neutrofilija postaje sve izraženija (77). Uloga neutrofila u KOPB-u i u razvoju opstrukcije dišnih putova je potvrđena na temelju povezanosti između broja neutrofila i FEV₁ kao mjere opstrukcije (77). Nekoliko studija s pušačima je pokazalo da postoji značajan obrnuti odnos broja neutrofila u perifernoj krvi i FEV₁ (77). Sadržaj duhanskog dima, osobito nikotin, uzrokuje kemotaksiju neutrofila, aktivaciju makrofaga iz pluća, bronhalnog i alveolarnog epitela te dolazi do oslobađanja kemokina koji dovode do priljeva neutrofila (77). Povećane vrijednosti LTB₄, IL-8 i TNF- α koji su svi jaki kemokini neutrofila su izmjereni u BAL-u i sputumu bolesnika s KOPB-om (77). Kod bivših pušača jednom započeta upalna reakcija, uzrokovana duhanskim dimom, ponavlja se spontano čak i kada nema više stimulacije duhanskim

dimom. Kod nekih osoba kod kojih se upalna reakcija spontano ponavlja dolazi do razvoja KOPB-a, dok kod drugih dolazi do oporavka, iako to zasad nije u potpunosti jasno (77). Egzacerbacije u KOPB-u su najčešće sekundarne zbog virusne ili bakterijske upale u plućima (82–84). Kao posljedica upalnog odgovora na infekciju dolazi do povećanja broja neutrofila, te do povećanja IL-8 i time porasta broja neutrofila u dišnim putovima tijekom egzacerbacije KOPB-a (82–84). Infiltracija neutrofila i CD8⁺ T-limfocita povećana je u glatkim mišićnim stanicama dišnih putova bolesnika pušača s KOPB-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima (82–84).

Monociti/makrofagi

Makrofagi su porodica mononuklearnih leukocita koji su široko rasprostranjeni u tkivima i sudjeluju u upalnom i imunosnom odgovoru (85). Fenotip makrofaga ovisi o mikrokolištu tkiva u kojem se nalazi. Alveolarni makrofagi potječu od monocita iz cirkulacije i od proliferirajućih prekursora makrofaga u intersticiju pluća (85). Monociti/makrofagi su važne efektorske stanice u KOPB-u jer luče ROS, proteine izvanstaničnog matriksa i lipidne medijatore, prostaglandine, LT-e, citokine, kemokine i MMP-ove (86,87). Pod utjecajem duhanskog dima dolazi do povećanja broja neutrofila i makrofaga u dišnim putovima (85). Histološke studije bronhalnih biopata i plućnog parenhima kod pušača pokazuju dominantno makrofage i CD8⁺ T stanice na mjestima destrukcije parenhima (85). Makrofagi igraju važnu ulogu u započinjanju neutrofilnog upalnog odgovora kod pušača (85). Alveolarni makrofagi se aktiviraju nakon izlaganja duhanskom dimu, a nakon aktivacije kemokinima, LT i neutrofilima; makrofagi i CD8⁺ i CD4⁺ T-limfociti se akumuliraju i to se nastavlja tijekom vremena (85).

T-stanice

T-limfociti čine većinu limfocita u plućima kod zdravih osoba. Locirani su u dišnim putovima, alveolarnom epitelu i intersticiju. U BAL-u se obično nalazi manje od 1×10^6 limfocita. Kod zdravih osoba, nepušača, CD4+ i CD8+ limfociti su prisutni u jednakim omjerima kao i u perifernoj cirkulaciji (28). Kod KOPB-a neki podaci govore da prevladava Th1 odgovor, dok u astmi prevladava Th2 odgovor i obrazac citokina (28). Ipak, u KOPB-u se nalaze i aktivirani Th1 i Th2 limfociti te se smatra da obje vrste stanica doprinose patogenezi bolesti (88). Th17 stanice su subpopulacija CD4+ stanica koje imaju ulogu u upalnim i autoimunim bolestima, te novija istraživanja uključuju i Th17 stanice u patogenezu KOPB-kao i IL-17 kojeg te stanice luče (50,88).

U KOPB-u je imunosni upalni odgovor karakteriziran makrofagima, neutrofilima, CD4+ i CD8+ T-limfocitima s dominacijom CD8+ T-limfocita u dišnim putovima i parenhimu pluća, a u astmi s T-limfocitima, eozinofilima i mastocitima (28,76,89,90). Ipak, imunosni odgovor na stimulaciju antigenom ovisi o obrascu citokina koji se otpušta iz aktiviranih CD4+ i CD8+ T-limfocita (28).

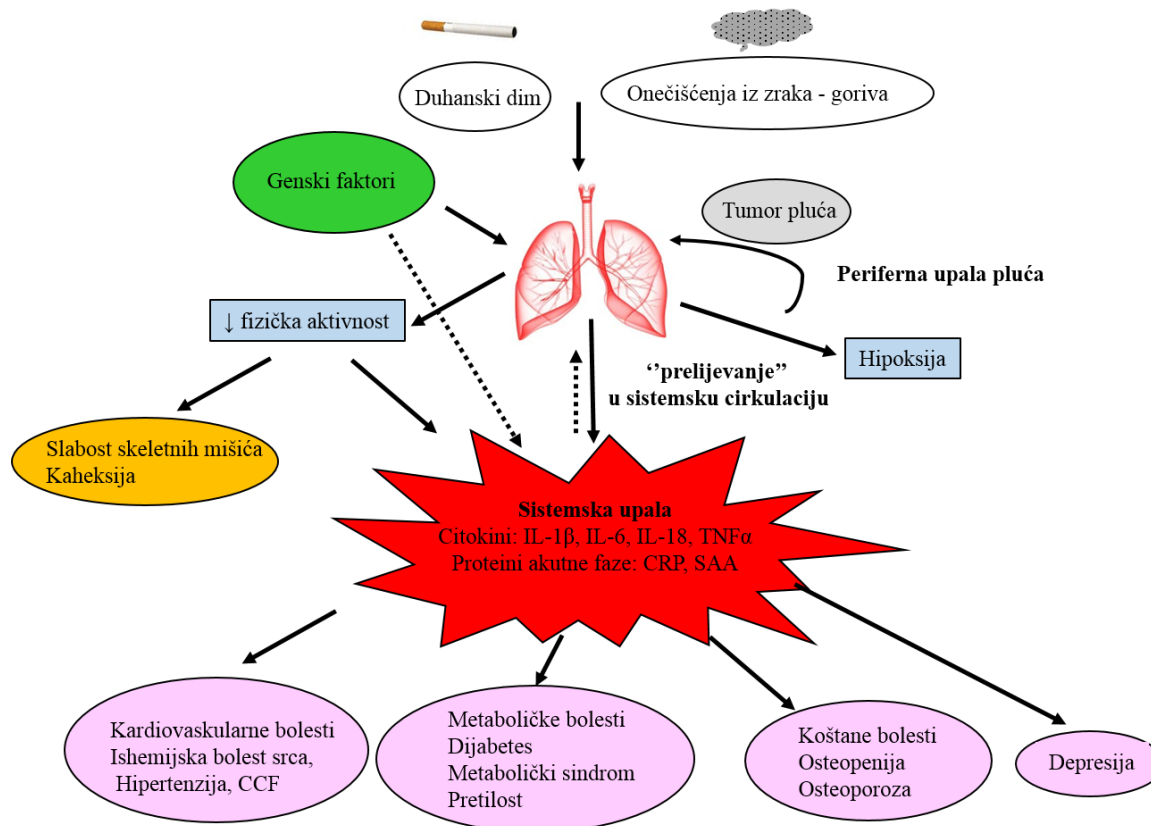
Smatra se da CD8+ T-stanice induciraju upalu pluća i emfizem kod KOPB-a na način da sintetiziraju granzim B, perforin i druge upalne medijatore (87,91–93). U plućnom parenhimu i dišnim putovima se akumuliraju CD8+ T-stanice te postoji povezanost s težinom opstrukcije dišnih putova (89,90). Aktivirane CD8+ T-stanice se diferenciraju u različite subpopulacije: Tc1 stanice koje stvaraju IFN- γ , Tc2 stanice koje stvaraju IL-4 i Tc17 stanice koje stvaraju IL-17. Te stanice sintetiziraju određene obrasce citokina i transkripcijskih faktora (94,95).

1.3.3 Komorbiditeti kronične opstruktivske plućne bolesti

Komorbiditeti u bolesnika s KOPB-om su česti i imaju značajan utjecaj na prognozu bolesti. Glavni i najčešći komorbiditeti u bolesnika s KOPB-om su kardiovaskularne bolesti uključujući ishemijsku bolest srca, zatajenje rada srca, fibrilaciju atriya i hipertenziju (7). U bolesnika s KOPB-om osteoporoza, anksioznost, depresija i oštećena kognitivna funkcija često nisu dijagnosticirane (7). U bolesnika s blagim KOPB-om povećana je i učestalost tumora pluća te je ovo najčešći uzrok smrti (7). Teške respiracijske infekcije su česte u bolesnika s KOPB-om (7). Prisutnost komorbiditeta ne bi trebala imati utjecaj na terapiju za KOPB, a komorbiditet bi trebalo liječiti kao da bolesnik nema KOPB (7).

KOPB je upalna bolest dišnih putova, glavno obilježje bolesti je prisutna kronična upala, a patofiziološke i patoanatomske promjene prisutne kod KOPB-a u dišnim putovima i plućnom parenhimu vode i oštećenju funkcije različitih organskih sustava, pa KOPB predstavlja složenu multisistemsku i multikomponentnu bolest (96). U bolesnika s KOPB-om komorbiditeti mogu nastati kao posljedica sistemske upale koja je prisutna u bolesnika (96). Sistemska posljedica KOPB-a je disfunkcija skeletnih mišića koja nastaje kao posljedica kronične upale i hipoksemije (96). Smatra se da TNF- α aktivira ekspresiju upalnih gena za citokine i time potiče upalu (96–98). U razvoju osteoporoze u KOPB-u smatra se da ključnu ulogu imaju upalni citokini TNF- α , IL-6 i IL-1 β koji utječu na aktivnost osteoklasta (96,99). Anemija je također često prisutna u bolesnika s KOPB-om. Smatra se da i u razvoju anemije ulogu igra pušenje, malnutricija i sistemska upala te da u tome sudjeluju citokini poput IL-6, IL-8 i TNF- α te CRP koji doprinose smanjenju broja eritrocita, iskorištavanju željeza i rezistenciji na eritropoetin (96,100).

U bolesnika s KOPB-om s perifernom upalom pluća dolazi do "prelijevanja" medijatora upale u sistemske cirkulaciju, što uzrokuje slabost skeletnih mišića, kaheksiju i povećava sklonost razvoju kardiovaskularnih, metaboličkih i koštanih bolesti te depresije (74,101). U bolesnika dolazi do povećanja koncentracije citokina i proteina akutne faze u cirkulaciji, a njihov utjecaj na razvoj komorbiditeta u KOPB-u prikazan je na Slici 5. (74,101). Opstrukcija dišnih putova utječe na smanjenje fizičke aktivnosti i uzrokuje hipoksiju što doprinosi slabosti mišića kao i prisutnim komorbiditetima (101). Genska predispozicija vjerojatno doprinosi razvoju KOPB-a kao i komorbiditeta kod pušača (101).



Slika 5. Prikaz utjecaja duhanskog dima i onečišćenja iz zraka na sistemska upala prisutnu u KOPB-i, te utjecaj citokina i proteina akutne faze na razvoj komorbiditeta u KOPB-i. Slika preuzeta iz (74,101).

CCF - kongestivno zatajenje srca (engl. *congestive cardiac failure*, CCF); CRP - C-reaktivni protein, SAA - serumski amiloid A; IL - interleukin; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α

1.3.4 Fenotipovi kronične opstruktivske plućne bolesti

Klasifikacija KOPB-a se temelji na stupnju nepotpune reverzibilne opstrukcije (padu FEV₁). Primjećeno je, međutim da to nužno ne odražava fenotipsku heterogenost populacije oboljelih koji, iako svi boluju od KOPB-a, imaju vrlo različite osobine (102,103). Dornhorst je još 1950. godine opisao razliku između fenotipova "*pink puffer*" (ružičasti puhaljko), u kojem dominira emfizem, i "*blue bloater*" (modri napuhanko), u kojem je dominantan kronični bronhitis.

U novijim istraživanjima za grupiranje heterogenih osobina u relativno homogene skupine, pri čemu su subjekti iste skupine sličniji jedni drugima nego subjektima iz drugih grupa, koriste se klusterske analize. Iz takvih klusterskih analiza je proizašla klasifikacija fenotipova KOPB-a (102,103). Tako su se identificirali osnovni fenotipovi KOPB-a: fenotip čestih egzacerbacija, emfizem – fenotip hiperinflacije, fenotip kroničnog bronhitisa, fenotip sa sistemskom upalom, fenotip brzoga gubitka plućne funkcije, sindrom preklapanja KOPB-ASTMA (ACOS – od engl. *Asthma-COPD Overlap Syndrome*) (103). Iako su u brojnim studijama prikazani i drugi fenotipovi, ovi su najčešći (103).

1.3.5 Kronična opstrukcijska plućna bolest i statini

Danas dostupna terapija za KOPB, za sada, ne zaustavlja progresiju bolesti. Jedino prestanak pušenja usporava razvoj bolesti i produžuje životni vijek bolesnika.

Statini su pokazali pleiotropni učinak u određenim bolesnim stanjima kao što su, naravno kardiovaskularne, ali i infektivne i plućne bolesti (5). Obzirom da je KOPB kronična upalna bolest pluća sa sistemskom upalom, smatra se da bi lijekovi koji utječu na prisutni upalni proces mogli doprinijeti boljitku u bolesnika s KOPB-om (5,8). Postoje studije koje pokazuju da bi upotreba statina u bolesnika s KOPB-om mogla imati utjecaj na usporavanje razvoja bolesti (9). Retrospektivne studije su pokazale da bolesnici s KOPB-om na terapiji sa statinima imaju manji mortalitet, manji broj hospitalizacija i smanjenu uporabu antibiotika (10,11). Ajmera i sur. su u opservacijskoj retrospektivnoj studiji procijenili da je u novodijagnosticiranih bolesnika s KOPB-om koji su statine uzimali dulje od 120 dana (4 mjeseca) smanjena učestalost egzacerbacija i hospitalizacija (104). Također, bolesnici s KOPB-om i komorbiditetima su imali dodatne koristi od terapije koje se tumače protuupalnim učincima statina (104).

Dokazi iz humanih i animalnih studija pokazuju da su imuno-modulacijski učinci statina prisutni i u sistemskoj i plućnoj cirkulaciji i mogu doprinijeti protuupalnom učinku kod KOPB-a (10). Mehanizmi ovih učinaka statina vjerojatno uključuju interferenciju s adhezijom i proliferacijom stanica, stimulaciju procesa apoptoze i promjene u oslobađanju citokina (5). Brojne studije u bolesnika s kardiovaskularnim oboljenjima su pokazale da statini smanjuju koncentraciju proteina akutne faze poput CRP-a i to nezavisno od svog djelovanja na smanjenje koncentracije lipida, što govori u prilog za njihovu potencijalnu uporabu kod upalnih bolesti (5).

Lee i sur. su u randomiziranoj studiji u bolesnika s KOPB-om na terapiji pravastatinom tijekom 6 mjeseci, primjetili smanjenje koncentracije CRP-a i IL-6 u plazmi bolesnika na statinima u odnosu na kontrolnu skupinu (105). Ipak, utjecaj pravastatina na funkciju pluća kod bolesnika s KOPB-om u toj studiji nije primjećen (105). Smatra se da bi bolesnici s KOPB-om kod kojih je prisutna veća koncentracija CRP-a, koji se smatra prediktorom mortaliteta i morbiditeta, možda mogli biti skupina bolesnika s KOPB-om koja će imati veće koristi od upotrebe statina (5). Naime, predložene novije podjele bolesnika s KOPB-om po fenotipu uključuju fenotip sa sistemskom upalom (103).

Lyngdoh i sur. su ispitivali utjecaj statina na koncentraciju CRP-a i protuupalnih citokina IL-1 β , IL-6 i TNF- α kod zdravih ispitanika bijele rase, te su dokazali da statini imaju učinak na smanjenje koncentracije CRP-a, ali ne i na koncentraciju citokina (106).

Frost i sur. su u jednoj studiji ispitivali povezanost uporabe statina i smanjenja rizika mortaliteta od influenze i pneumonije kod KOPB-a te uočili da su ispitanici koji su koristili umjerenu dozu statina imali manju stopu mortaliteta kod ovih oboljenja (107).

1.3.6 Kronična opstruktivska plućna bolest i citokini

Citokini imaju ključnu ulogu u lokalnoj i sistemske upali u bolesnika s KOPB-om (75). Pluća su posebno ovisna o regulaciji imunskog i upalnog odgovora zbog izlaganja velikom broju štetnih plinova i čestica tijekom izmjene plinova u plućima (85,108). Citokini prisutni u plućima reguliraju i početak i održavanje imunskog i upalnog odgovora (108). Citokini: 1) iniciraju i amplificiraju upalu; 2) induciraju aktivaciju makrofaga neovisnu o T-stanicama; 3) reguliraju sazrijevanje i diferencijaciju dendritičnih stanica; 4) reguliraju aktivaciju i diferencijaciju T-stanica; 5) modificiraju strukture vezivnog tkiva; 6) reguliraju rast krvnih žila (108).

Upalni citokini i proteini akutne faze povećani su u bolesnika sa stabilnim KOPB-om kao i pri egzacerbacijama KOPB-a te su povezani s plućnom i sistemskom upalom (109). Upalni citokini, kao što su TNF- α , IL-1 β , IL-6, su povećani u bolesnika s KOPB-om i čini se da amplificiraju upalu, djelomično preko aktivacije NF- κ B, što dovodi do povećane ekspresije mnogih upalnih gena (47). Patts i sur. su pokazali da su IFN- γ i TNF- α iz CD8⁺ T-limfocita povećani u bolesnika s KOPB-om u odnosu na zdrave ispitanike te da postoji korelacija između tih dvaju citokina i GOLD stupnja KOPB-a (110).

Aaron i sur. su ispitivali biomarkere u serumu i sputumu bolesnika s KOPB-om. Vrijednosti IL-6 i IL-8 u serumu su bile ispod granice detekcije testa za neke bolesnike s KOPB-om i većinu kontrolnih ispitanika (111). CRP, mijeloperoksidaza, vaskularni endotelni faktor rasta (*engl. vascular endothelial growth factor*, VEGF) i eotaksin-2 u serumu, te IL-6, IL-8, TIMP-1 i VEGF u sputumu, su pokazali korelaciju s težinom oštećenja plućne funkcije i dispnejom (111).

Pinto-Plata i sur. su tijekom 3 godine pratili bolesnike s KOPB-om te povezali određene upalne biomarkere s kliničkim ishodom bolesti (51). Koncentracije IL-6, IL-8, IL-16 i TNF- α su bile povećane kod bolesnika s KOPB-om, te su bolesnici s težim oblikom KOPB-a prema GOLD klasifikaciji imali povišene koncentracije citokina, dok su markeri ozljede i zarastanja MMP-9 i

VEGF bili sniženi (51). Ovi autori su također razvili tzv. *OSCAR plot* (engl. *ObServed Clinical Association Results*) gdje su povezali klinički ishod bolesti s koncentracijama biomarkera, što znači da bolesnici s izrazito povišenim vrijednostima upalnih markera imaju teži oblik bolesti i veći mortalitet (51).

IL-1 β aktivira makrofage u bolesnika s KOPB-om koji oslobađaju upalne citokine, kemokine i MMP-ove (50). Koncentracija IL-1 β je povećana u sputumu bolesnika s KOPB-om, korelira s težinom KOPB-a, a snižena je koncentracija receptora za IL-1 β (112).

Koncentracija IL-4 u CD8⁺ T-limfocitima kod bolesnika s KOPB-om nije bila značajno povećana u usporedbi sa zdravim ispitanicima (110).

Povećane koncentracije IL-5 nađene su u bolesnika s KOPB-om tijekom egzacerbacija, ali u specifičnim fenotipovima preklapanja astme i KOPB-a (113).

Koncentracija IL-6 je povećana u sputumu, kondenzatu izdaha i plazmi bolesnika s KOPB-om, posebno tijekom egzacerbacija KOPB-a (114,115). Smatra se da IL-6 doprinosi oštećenju funkcije endotelnih stanica, rezistenciji na inzulin, osteoporozi i depresiji te se smatra da ima ulogu u nekim sistemskim manifestacijama KOPB-a te u pogoršanju komorbiditeta (6). IL-6, TNF- α i CRP mjereni tijekom 12 mjeseci kod bolesnika s KOPB-om su dali ponovljive vrijednosti, što znači da su pouzdani biomarkeri za mjerenje u serumu (116). Nadalje, Kolsum i sur. su pokazali da postoji korelacija između CRP-a i IL-6 u serumu bolesnika s KOPB-om (116). IL-6 praćen tijekom 3 godine u plazmi bolesnika s KOPB-om, povećava se s napredovanjem bolesti, te bi se mogao koristiti kao pomoć pri procjeni napredovanja bolesti (117). Također veće povećanje koncentracije IL-6 je povezano s mortalitetom i smanjenom tolerancijom na vježbanje (117).

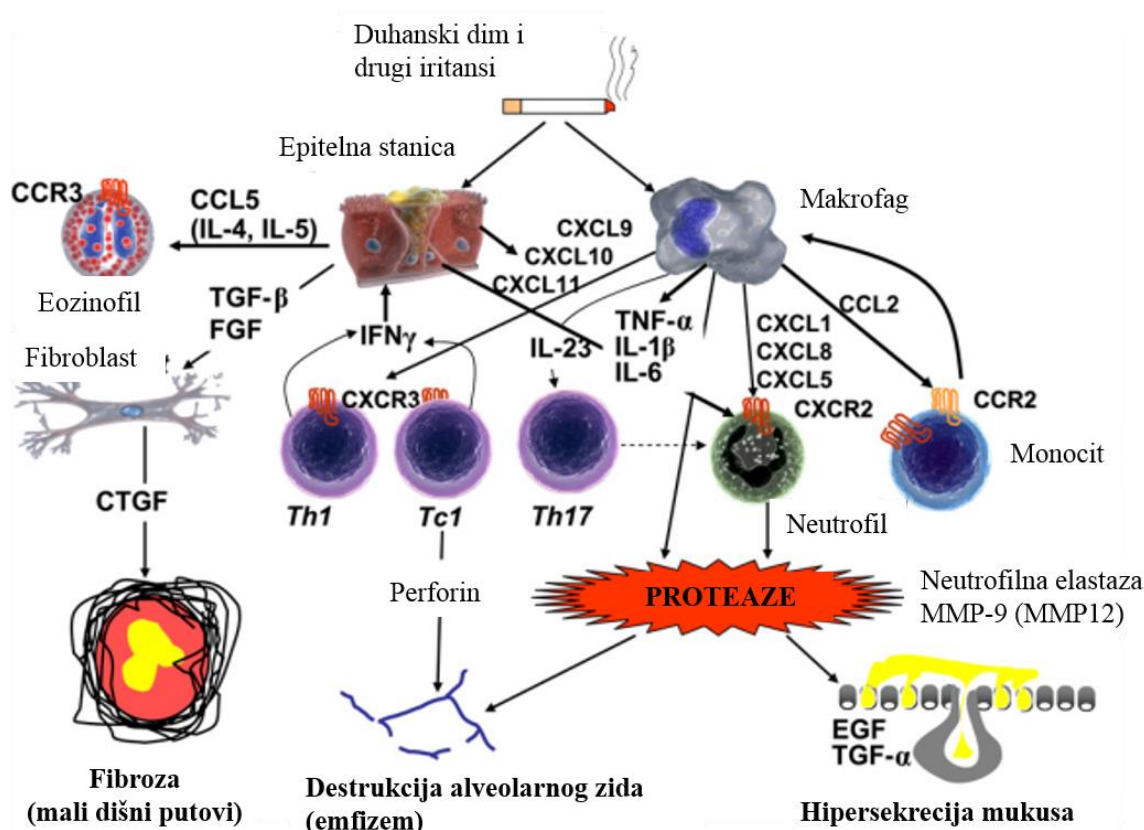
Koncentracija IL-10 je snižena u sputumu bolesnika s KOPB-om (118) i smanjeno je oslobađanje IL-10 iz pluća nakon stimulacije lipopolisaharidima (LPS) u bolesnika s KOPB-om u odnosu na pušače s normalnom funkcijom pluća (119).

TNF- α je upalni citokin koji se oslobađa iz mnogih stanica koje su dio respiracijskog sustava kao što su: epitelne i glatke mišićne stanice dišnih putova, alveolarni makrofagi i T-limfociti. TNF- α aktivira endotelne i epitelne stanice, APC stanice, monocite/makrofage, utječe na oslobađanje MMP-ova iz makrofaga te oslobađanje IL-8 iz epitelnih stanica te time utječe na kemotaksiju i migraciju neutrofila (26,27). Oslobađanje TNF- α iz monocita/makrofaga se povećava pod utjecajem IL-1, GM-CSF i IFN- γ (26,27). Polimorfizam gena za TNF- α u 5' promotorskoj regiji (pozicija 308, TNF2 varijanta) je nađena u bolesnika s KOPB-om azijskog

podrijetla, međutim druge studije koje su uključivale osobe bijele rase nisu našle opisani polimorfizam (120). TNF-308 A alel se smatra značajnim rizičnim faktorom za razvoj KOPB-a u azijskoj populaciji (120). TNF- α je povišen u induciranom sputumu bolesnika s KOPB-om, osobito tijekom egzacerbacija (81,121). Povećane koncentracije TNF- α i topljivih receptora za TNF- α u serumu i sputumu ukazuju na važnu ulogu TNF- α u KOPB-u (122). U induciranom sputumu bolesnika s KOPB-om i tijekom egzacerbacija, nađena je povećana koncentracija TNF- α (53). Koncentracija TNF- α je povećana i u monocitima iz periferne krvi, te se smatra da je povezana s kaheksijom i apoptozom stanica skeletnih mišića u bolesnika s težim oblicima KOPB-a (53).

Moermans i sur. mjerili su sljedeće citokine: IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α i IFN- γ u 24-satnim staničnim kulturama krvnih stanica i sputumu bolesnika s KOPB-om. Našli su povećanu neutrofilnu upalu u dišnim putovima bolesnika s KOPB-om sa značajno sniženim koncentracijama IL-6, IL-10 i TNF- α te povećanim IFN- γ , ali ne i IL-4 u kulturi stanica sputuma (123). Njihovi nalazi upućuju kako Th1 profil citokina prevladava kod upale dišnih putova u KOPB-u (123). Autori smatraju da IFN- γ predstavlja imunosni odgovor na mikrobiološke agense (123). U kulturi stanica iz periferne krvi u bolesnika s KOPB-om bila je povećana sinteza IFN- γ , IL-10 i TNF- α (123). Povećano stvaranje IFN- γ opet ukazuje na Th1 odgovor na sistemskoj razini (123). Također, nađena je korelacija TNF- α s GOLD stupnjem, kao i inverzna korelacija s indeksom tjelesne mase (ITM) što ukazuje na kaheksiju kod uznapredovalog KOPB-a, te na ulogu TNF- α u sistemskoj upali (123). IL-6, kao najvažniji citokin za poticaj sinteze proteina akutne faze, nije pokazao povećanje, možda zbog činjenice da se radilo o bolesnicima sa stabilnim KOPB-om (123).

Slika 6. prikazuje mrežu citokina i faktora rasta koji se oslobađaju pod utjecajem duhanskog dima, te imaju ulogu u razvoju fibroze malih dišnih putova, emfizemu i hipersekreciji mukusa (50).



Slika 6. Citokini uključeni u KOPB. Slika preuzeta iz (50).

Citokini i faktori rasta (TGF- β , FGF) se oslobađaju pod utjecajem inhaliranih iritansa (duhanski dim) iz aktiviranih epitelnih stanica i makrofaga te dolazi do stimulacije proliferacije fibroblasta i do fibroze u malim dišnim putovima. Epitelne stanice i makrofagi oslobađaju upalne citokine kao što su TNF- α , IL-1 β , i IL-6 i kemokine. CCL2 djeluje putem svojih receptora (CCR2) za privlačenje monocita (u plućima se diferenciraju u makrofage), CXCL1 i IL-8 djeluju putem CXCR2 i privlače neutrofilne granulocite i monocite, te CXCL9, CXCL10 i CXCL11 te djeluju putem CXCR3 receptora na privlačenje Th1 stanica i Tc1 stanica, koje ispuštaju IFN- γ , koji stimulira daljnje oslobađanje CXCR3-vezajućih kemokina. Hipersekrecija mukusa je stimulirana s EGF-om i TGF- α .

IL - interleukin; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; CCL - CC-kemokin ligand; CCR - receptor za CC-kemokine; CXCL - CXC-kemokin ligand; CXCR - receptor za CXC-kemokine; TGF- α – transformirajući čimbenik rasta (*engl. transforming growth factor*) EGF – epitelni čimbenik rasta (*engl. epithelial growth factor*); FGF – čimbenik rasta fibroblasta (*engl. fibroblast growth factor*); Tc1 – T-citotoksične stanice-1 (*engl. cytotoxic T cells*); Th1 - T-pomagačke stanice -1 (*engl. T-*

helper cells); Th17 - T-pomagačke stanice-17 (engl. T-helper cells); Th2 - T-pomagačke stanice-2 (engl. T-helper cells); MMP – metaloproteinaza matriksa; CTGF – čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*)

1.3.7 Apoptoza i nekroza stanica kod kronične opstruktivske plućne bolesti

Apoptoza je programirana stanična smrt (124). Tijekom procesa apoptoze dolazi do karakterističnih morfoloških i biokemijskih promjena stanica (124). Apoptoza je proces koji je nužan za održavanje normalne homeostaze stanica, odnosno ravnoteže između gubitka i stvaranja stanica u fiziološkim okolnostima u tkivima tijekom života (125,126). Apoptoza je potrebna za pravilan razvoj i funkcioniranje imunskog sustava i tijekom embriogeneze (126). Prije se taj proces prepoznavao kao "nekroza jedne stanice" te je opisan od patologa, prije više od sto godina, koji su proučavali bolesti jetre i koristili nazive kao "hijalina" ili "acidofilna tjelešca" (124). Kerr i sur. su 1972. godine definirali i eksperimentalno potvrdili ovaj oblik stanične smrti i predložili naziv "apoptoza" za opći mehanizam kontrolirane stanične delecije, odnosno kontroliranu staničnu smrt (127). Glavni morfološki kriteriji apoptoze su: smanjivanje obima stanice, kondenzacija i marginalno nakupljanje kromatina u jezgri, fragmentacija DNA, vakuolizacija citoplazme i liza stanice, te izostanak upalne reakcije (124,128). Apoptozne stanice se uklanjaju procesom fagocitoze (eferocitoza) (125). Neodgovarajuća apoptoza je čimbenik u razvoju mnogih humanih bolesti kao što su neurodegenerativne, ishemijske, autoimune bolesti i mnogi tipovi tumora (126).

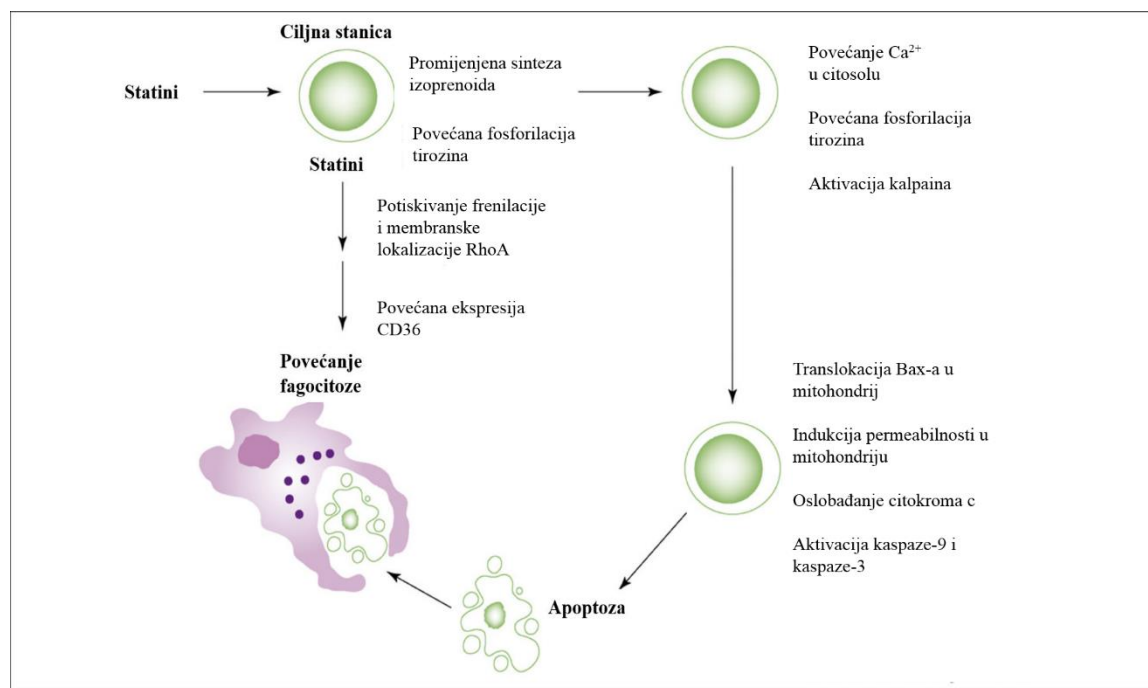
Nekroza je nekontrolirana smrt stanice čiji uzrok leži u okolnostima izvan same stanice (124). Proces nekroze počinje kada stanica umire i to je ireverzibilan proces bez povratka za sam život stanice (128). Apoptoza i nekroza su dva različita oblika stanične smrti (128). Razlika između apoptoze i nekroze se može ustanoviti na temelju morfoloških i biokemijskih kriterija (124). Tijekom nekroze prisutne su sljedeće morfološke promjene: nepravilno nakupljanje kromatina u jezgri, raspadanje citoplazmatskih organela, stvaranje mjehurića u staničnoj membrani i gubitak integriteta stanice te stanica bubri (124). Tijekom nekroze istovremeno je zahvaćeno više skupina stanica, te je nekroza obično odgovor na proces upale (124).

Apoptoza upalnih stanica, prekomjerna apoptoza ili smanjeni klirens stanica u apoptozi (eferocitoza) koje su prisutne u plućima, vjerojatno imaju ulogu u patogenezi KOPB-a (129–131). Istraživanja su pokazala: smanjen broj apoptoznih neutrofila periferne krvi tijekom egzacerbacija

KOPB-a (132), smanjenu apoptozu CD8⁺ T limfocita iz dišnih putova bolesnika s KOPB-om (133), ali i povećan broj apoptoznih CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita iz periferne krvi bolesnika s akutnim egzacerbacijama KOPB-a (134).

Statini, pokazuju i protuupalni i protu-oksidacijski učinak i imaju utjecaj na proces apoptoze kod različitih vrsta stanica (5,131). Učinak statina na apoptozu raznih vrsta stanica u bolesnika s KOPB-om je proučavan *in vitro* i *in vivo*. Rezk i Elewa su otkrili da statini smanjuju ukupan broj upalnih stanica i neutrofila u sputumu (8). Morimoto i sur. su pokazali da lovastatin povećava eferocitozu *in vitro* i *in vivo* i ukazuje na ulogu u patogenezi KOPB-a (135). Eferocitoza ima ulogu u upali, a inhibirana je s RhoA (135). Stoga su Morimoto i sur. pokazali da je lovastatin utjecao na povećanje procesa eferocitoze u primarnim humanim makrofagima *in vitro*, na animalnom modelu pluća i kod humanih alveolarnih makrofaga *ex vivo* uzetih od bolesnika s KOPB-om (135). Lovastatin je povećao eferocitozu *in vitro* putem inhibicije HMG-CoA reduktaze, inhibirajući geranilgeranilaciju i farnelizaciju, te učinkom na inhibiciju RhoA (135).

Potencijalni mehanizam kojim statini induciraju apoptozu ciljnih stanica je prikazan na Slici 7. (131).



Slika 7. Potencijalni mehanizam kojim statini induciraju apoptozu ciljne stanice. Slika preuzeta iz (131).

Statini utjecajem na sintezu izoprenoida utječu na povećanu fosforilaciju tirozina, te dolazi do porasta koncentracije kalcija u citosolu i time aktivacije kalpaina. Kalpain smanjuje omjer Bcl-2/Bax, dolazi do oslobađanja citokroma c iz mitohondrija i aktivacije kaspaze-9 i kaspaze-3. Učinak statina je nadalje amplificiran povećanim fagocitnim uklanjanjem stanica u apoptozi, preko potiskivanja frenilacije i lokalizacije RhoA u membrani. Statini također uzrokuju povećanje ekspresije receptora aktiviranog s proliferatorom peroksisoma (*engl. peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR) i utječu na prepoznavanje stanica u apoptozi i posljedično na fagocitozu humanim alveolarnim makrofagima putem povećane ekspresije receptora CD36, koji je receptor za prepoznavanje stanica u procesu apoptoze.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

KOPB je progresivna kronična upalna bolest pluća sa sistemskim manifestacijama i brojnim komorbiditetima (6). Glavni uzročnik razvoja KOPB-a je duhanski dim (7). Tijekom 2016. godine prevalencija KOPB-a u svijetu je iznosila 251 milijuna slučajeva (67). KOPB je globalno uzrokovao 3,17 milijuna smrti u 2015. godini, što čini ukupno 5 % smrtnih slučajeva tijekom te godine u svijetu (67). Trenutno dostupna terapija za KOPB ne zaustavlja progresiju bolesti (5,8). KOPB je plućna bolest s prisutnom sistemskom upalom, pri čemu su povećane koncentracije citokina, kemokina i reaktanata akutne faze te su prisutne abnormalnosti kod stanica u cirkulaciji (6). Smatra se da bi lijekovi koji utječu na prisutni upalni proces kod KOPB-a mogli doprinjeti poboljšanju stanja u bolesnika s KOPB-om (5,8). Postoje studije koje pokazuju da bi upotreba statina u bolesnika s KOPB-om mogla imati utjecaj na usporavanje razvoja bolesti (9). Kliničke opservacijske studije pokazuju da bolesnici s KOPB-om na terapiji sa statinima imaju smanjenu učestalost egzacerbacija i time manji broj hospitalizacija, smanjena je uporaba antibiotika i manji je mortalitet (10,11).

Statini su inhibitori HMG-CoA reduktaze (1,2). Primjenjuju se za inhibiciju sinteze i snižavanje koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola kod pojedinih vrsta hiperlipoproteinemija (3). Koriste se kako bi se smanjio rizik od kardiovaskularnih bolesti, međutim, statini pokazuju i pleiotropne učinke (1–3). Kliničke studije pokazuju pleiotropni i protuupalni učinak i u bolestima koje nisu vezane uz snižavanje koncentracije LDL-kolesterola, kao što su plućne, infektivne i neke autoimune bolesti (4,5). Smatra se da smanjuju incidenciju i mortalitet kod pneumonije, smanjuju učestalost venske tromboembolije, kod reumatoidnog artritisa smanjuju mortalitet i koncentraciju upalnih markera, kod bubrežne bolesti utječu na smanjenje koncentracije kreatinina te na učestalost stvaranja žučnih kamenaca (4). Opisani pleiotropni učinci statina su: poboljšanje funkcije endotelnih stanica, smanjenje upalnog odgovora, smanjenje oksidacijskog stresa, utjecaj na oslobađanje citokina, na apoptozu pojedinih staničnih vrsta te na inhibiciju trombogenog odgovora (5,19).

Glavna hipoteza ovoga istraživanja je da statini a) djeluju protuupalno u bolesnika s KOPB-om, inhibiranjem upalnih citokina i aktivacijom imunopoticajnih citokina te da b) statini smanjuju upalni proces u KOPB-u putem apoptoznog djelovanja na populacije leukocita.

Cilj istraživanja je ispitati pleiotropni učinak statina u bolesnika s KOPB-om, odnosno ustanoviti doprinose li statini smanjenju i/ili usporavanju progresije KOPB-a. Učinak statina u bolesnika s KOPB-om pratiti će se testovima plućne funkcije, biljezima sistemske upale te će se procijeniti doprinos boljoj kvaliteti života oboljelih.

Specifični ciljevi:

- I.** Odrediti koncentraciju citokina IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TNF- β , IL-12 p70, IFN- γ u plazmi bolesnika s KOPB-om koji nisu na terapiji statinima i u bolesnika koji su na terapiji statinima dulje od godinu dana.
- II.** Modificirati metodu za određivanje apoptoze i nekroze u subpopulacijama leukocita za protočnu citometriju sa CD45 antitijelom i reagens kitom Aneksin-V-FITC. Primjeniti TUNEL metodu za vizualizaciju stanica u procesu apoptoze i nekroze.
- III.** Odrediti relativni udio apoptoznih i nekroznih subpopulacija leukocita: granulocita, limfocita i monocita periferne krvi bolesnika s KOPB-om koji nisu na terapiji statinima i u bolesnika koji su na terapiji statinima dulje od godine dana.
- IV.** Odrediti biokemijske parametre: kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceride, glukozu, ureju, kreatinin, natrij, kalij, kloride, ukupni bilirubin, AST, ALT, GGT, ALP, LD, CK, ALP, AMS, ukupne proteine, albumine, CRP, mokraćnu kiselinu, željezo i UIBC u serumu bolesnika s KOPB-om koji nisu na terapiji statinima i u bolesnika koji su na terapiji statinima dulje od godinu dana.
- V.** Odrediti kompletnu krvnu sliku u bolesnika s KOPB-om koji nisu na terapiji statinima i u bolesnika koji su na terapiji statinima dulje od godinu dana.
- VI.** Ispitati međusobnu povezanost izmjerenih citokina u bolesnika s KOPB-om.
- VII.** Ispitati obrazac koncentracije izmjerenih citokina u bolesnika s KOPB-om.
- VIII.** Usporediti koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om zavisno od klasifikacije po GOLD stadiju.
- IX.** Usporediti utjecaj pušačkih navika na koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om.
- X.** Odrediti utjecaj ITM na koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om.

- XI.** Odrediti utjecaj inhalacijskih kortikosteroida na koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om.
- XII.** Odrediti utjecaj antihipertenziva na koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Ispitanici

Studija je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Klinike za plućne bolesti "Jordanovac" i od Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb te od Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Svi ispitanici su potpisali Informirani pristanak i dobili Obavijest za ispitanike te ispunili Anketni upitnik s podacima o tjelesnoj visini, tjelesnoj masi, pušačkim navikama, tjelesnoj aktivnosti, profesionalnoj izloženosti i dodacima prehrani koje uzimaju (vitamini, prehrana i sl). Ispitanici su bili bolesnici s dijagnozom KOPB-a u stabilnoj fazi bolesti.

Kriteriji isključivanja bolesnika bili su:

- akutni infarkt miokarda unutar zadnja 2 mjeseca
- bolesnici s bolestima jetre
- bolesnici s bolestima bubrega
- bolesnici s autoimunim i malignim bolestima
- bolesnici koji su imali egzacerbaciju unutar zadnja 3 mjeseca
- bolesnici koji su na terapiji protuupalnim lijekovima kao što su kortikosteroidi (osim lokalne primjene inhalacijskih kortikosteroida) i nesteroidni protuupalni lijekovi (acetilsalicilna kiselina).

Kontrolna skupina uključivala je 66 bolesnika sa stabilnim KOPB-om (GOLD A-D), a testna skupina 34 bolesnika sa stabilnim KOPB-om (GOLD A-D) koji su na terapiji statinima dulje od godine dana.

Bolesnicima se vadila puna venska krv ujutro i obavezno natašte, te su im izvađene tri epruvete krvi:

- s antikoagulansom litijevim-heparinatom – nakon centrifugiranja na 3200 okr./min. plazma bolesnika pohranila se na -80 °C. U tom uzorku nakon odmrzavanja određena je koncentracija citokina: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ , TNF- α , TNF- β
- s antikoagulansom K₃EDTA – odredila se odmah kompletna krvna slika na hematološkom brojaču. Nakon toga odmah je određene relativni udio apoptoznih i nekroznih stanica u subpopulacijama leukocita - granulocitima, limfocitima i monocitima
- bez antikoagulansa - nakon centrifugiranja na 3200 okr/min. u serumu su određeni biokemijski parametri.

3.1.2 Reagensi

- Human Th1/Th2 11plex Kit FlowCytomix, BMS810FF, eBioScience, Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria
- CD45-PC7, IOTest Conjugated Antibody, IM3548, Beckman Coulter, SAD
- Annexin-V – FITC Kit - Apoptosis Detection Kit, PN IM3546, Beckman Coulter, SAD

3.2 Metode

3.2.1 Spirometrija

Spirometrija je metoda za mjerenje plućne funkcije, to je jednostavan test kojim se mjeri količina zraka koju osoba može izdahnuti i vrijeme koje je potrebno za taj izdah (136). Spirometar je uređaj koji mjeri koliko učinkovito i koliko brzo se pluća mogu isprazniti (136). Spirogram je krivulja koja pokazuje odnos volumen-vrijeme (136). Mjere se statički i dinamički plućni volumeni i kapacitet te protok – vitalni kapacitet (VC), forsirani vitalni kapacitet (FVC), forsirani izdisajni volumen u 1 sekundi (FEV_1), Tiffeneauov indeks FEV_1/FVC , vršni izdisajni protok (PEF), forsirani izdisajni protok na 25 % FVC-a (FEF_{75}), forsirani izdisajni protok na 50 % FVC-a (FEF_{50}), forsirani izdisajni protok na 75 % FVC-a (FEF_{25}) (137). FVC je maksimalan volumen zraka koji se može izdahnuti tijekom forsiranog izdaha (136).

FEV_1 je volumen tijekom izdaha u 1 sekundi nakon maksimalnog izdisaja, a nakon maksimalnog udisaja (136). Ovo je mjera koliko se brzo pluća mogu isprazniti (136).

FEV_1/FVC : FEV_1 izražen kao omjer u odnosu na FVC daje klinički koristan indeks za procjenu ograničenog protoka zraka (136).

Omjer FEV_1/FVC je između 0,70 i 0,80 kod zdravih odraslih osoba. Vrijednost manja od 0,70 ukazuje na ograničenje protoka zraka i time na KOPB, s time da se ta vrijednost ne mijenja značajno kroz najmanje šest mjeseci, i ako se mjeri postbronhodilatacijski (70,136). Na vrijednost FEV_1 utječe dob, spol, tjelesna visina i etnička pripadnost i najbolje se izražava kao udio predviđene (prediktivni FEV_1) normalne vrijednosti (136).

Spirometrija je potrebna za kliničko postavljanje dijagnoze KOPB-a (136). Sa simptomima bolesnika i spirometrijom može se ustanoviti težina/stupanj oboljenja što može doprinjeti i odluci o terapiji (136). Normalni spirometrijski pokazatelji isključuju KOPB (136). Manji udio prediktivnog FEV_1 ukazuje na lošiju prognozu KOPB-a (136). Tijekom vremena FEV_1 se smanjuje, brže u oboljelih s KOPB-om nego u zdravih osoba, te služi za praćenje napredovanja bolesti, ali je potrebno spirometriju provoditi u vremenskim intervalima najmanje od 12 mjeseci, nikako više (136).

3.2.2 Hematološki i biokemijski parametri

Parametri kompletne krvne slike (KKS) su određivani na hematološkom brojaču UniCell DxH 800, Beckman Coulter. Vrijednosti biokemijskih parametara određene su na biokemijskom analizatoru AU680, Beckman Coulter s reagensima tvrtke Beckman Coulter. CRP je određen na analizatoru BN ProSpec, Siemens s reagensima tvrtke Siemens. Tablica 3. prikazuje mjerne metode za biokemijske parametre.

Tablica 3. Mjerne metode biokemijskih parametara

Biokemijski parametri	Metoda
Kolesterol (mmol/L)	Fotometrija s kolesterol-oksidazom (CHOD-PAP)
Trigliceridi (mmol/L)	Fotometrija s glicerofosfat-oksidazom (GPO-PAP)
HDL-kolesterol (mmol/L)	Homogena enzimska metoda
LDL-kolesterol (mmol/L)	Homogena enzimska metoda
Glukoza (mmol/L)	Fotometrija UV s heksokinazom
Ureja (mmol/L)	Fotometrija UV s ureazom i glutamat-dehidrogenazom
Kreatinin (μmol/L)	Nekompenzirana fotometrijska Jaffe-ova metoda
Natrij (mmol/L)	Indirektna potencijometrija
Kalij (mmol/L)	Indirektna potencijometrija
Kloridi (mmol/L)	Indirektna potencijometrija
Bilirubin ukupni (μmol/L)	Fotometrija s diazo reagensom
AST (U/L)	Fotometrija UV, 37°C, bez piridoksal-fosfata (PP)
ALT (U/L)	Fotometrija UV, 37°C, bez piridoksal-fosfata (PP)
GGT (U/L)	Fotometrija UV, preporučena IFCC metoda, 37 °C
LD (U/L)	Fotometrija UV, preporučena IFCC metoda, 37 °C
CK (U/L)	Fotometrija UV, preporučena IFCC metoda, 37 °C
ALP (U/L)	Fotometrijska, preporučena IFCC metoda, 37°C
AMS (U/L)	Fotometrijska IFCC metoda, 37 °C (EPS-G7-PNP)
Ukupni proteini (g/L)	Fotometrija s biuret reagensom

Albumin (g/L)	Fotometrija s bromkrezol-zelenilom
Mokraćna kiselina (μmol/L)	Fotometrija UV s urikazom
CRP (mg/L)	Imunonefelometrija
Željezo (μmol/L)	Fotometrija s 2,4,6-Tri (2 piridil)-5-triazinom (TPTZ)
UIBC (μmol/L)	Fotometrija s nitrozo-PSAP

LDL- lipoproteini niske gustoće; HDL- lipoproteini visoke gustoće; AST- aspartat-aminotransferaza; ALT- alanin-aminotransferaza; GGT- γ-glutamil-transferaza; LD- laktat-dehidrogenaza; CK- kreatin-kinaza; ALP- alkalna fosfataza; AMS- amilaza; CRP- C-reaktivni protein; UIBC- nezasićeni kapacitet vezanja željeza (*engl. unsaturated iron binding capacity*)

3.2.3 Procjena glomerularne filtracije MDRD jednadžbom

U kliničkoj praksi bubrežna se funkcija obično procjenjuje na temelju koncentracije kreatinina u serumu (138). Procjena brzine glomerularne filtracije (*engl. estimated glomerular filtration rate, eGFR*) je moguća sa jednadžbama koje se temelje na koncentraciji kreatinina u serumu i demografskim obilježjima bolesnika.

U ovom radu za izračun eGFR za sve bolesnike s KOPB-om korištena je pojednostavljena MDRD2 (*engl. Modification of Diet in Renal Disease Study, MDRD Study*) formula (138–140), zbog mjerenja kreatinina nestandardiziranom nekompenziranom Jaffe-ovom reakcijom:

$$\text{eGFR} = 186 \times S (\text{kreatinin u mg/dL})^{-1.154} \times \text{godine}^{-0.203} \times 1.212 (\text{za osobe crne rase}) \times 0.742$$

(za osobe ženskog spola)

3.2.4 Određivanje pušačkih godina

Bolesnici su u anketnom upitniku dali izjave o navikama pušenja, koji broj cigareta dnevno su pušili i tijekom koliko godina, te su na temelju tih parametara izračunate pušačke godine bolesnika:

Pušačke godine (Pack/Year) = (broj cigareta dnevno/20) x godine pušenja.

3.2.5 Određivanje koncentracije citokina protočnom citometrijom

Princip fluorescentnog imunotesta s kuglicama

- Kuglice su obožene s antitijelima koja specifično reagiraju s antigenima (analitima) koji se detektiraju u multiplex sustavu. Kuglice se razlikuju po veličini i po specifičnom spektru emitiranja svjetlosti.
- Mješavina obloženih kuglica za svaki analit se inkubira s uzorcima ili standardima. Analiti prisutni u uzorku se vežu na antitijela koja su vezana na fluorescentne kuglice.
- Biotinom-konjugirano sekundarno antitijelo se dodaje, a specifično antitijelo se veže na analit koji je obilježen/uhvaćen već prvim antitijelom.
- Streptavidin-fikoeritrin se dodaje i veže se na konjugat biotina i emitira fluorescentni signal.

Dva seta kuglica različitih veličina se koriste u FlowCytomix-u

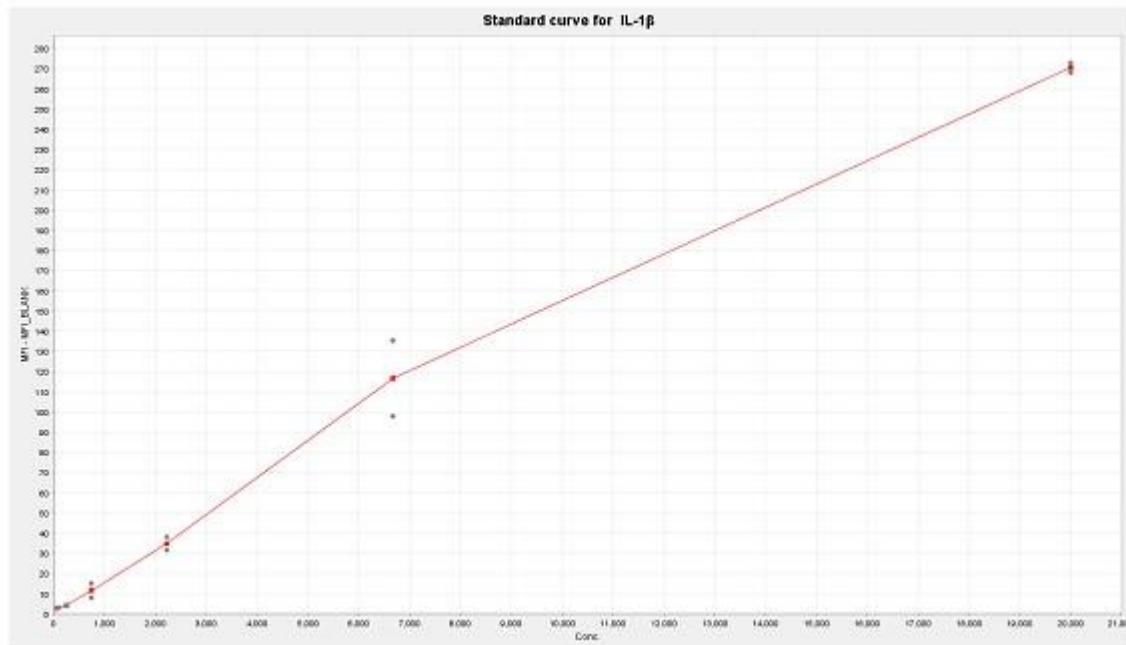
- Veličina A: 5 μm – sastoji se od 11 populacija kuglica
- Veličina B: 4 μm - sastoji se od 9 populacija kuglica
- Interno se boje različitim intenzitetom fluorescentnih boja, boja se eksitira s argon ili He-Ne laserom u crvenom dijelu spektra (700 nm).

Protokol testa za mjerenje citokina

1. Otpipetirati 50 μL pufera za test u sve jažice (za ovlažiti). Aspirirati sav pufer s pumpom.
2. Otpipetirati 25 μL standardne razrijeđene mješavine 1 do 7 u određene jažice.
3. Otpipetirati 25 μL pufera za test u slijepe jažice (slijepa).
4. Otpipetirati 25 μL standardne razrijeđene mješavine 1 u jažicu A3 - za namještanje citometra.
5. Otpipetirati po 25 μL svakog uzorka plazme u odgovarajuće jažice.
6. Otpipetirati 25 μL mješavine kuglica u sve jažice – uključujući i jažice za slijepu.
7. Otpipetirati 50 μL reagens biotin-konjugat u sve jažice – uključujući i slijepu jažice.
8. Pokriti ploču s adhezivnim filmom, zamotati u aluminijsku foliju da se zaštiti od svjetla i inkubirati 2 sata na 500 rpm na tresilici na sobnoj temperaturi.
9. Pripremiti otopinu streptavidin-fikoeritrin (streptavidin-PE).
10. Nakon 2 sata ukloniti adhezivni film i isprazniti jažice s pumpom.
11. Dodati 100 μL pufera za test u sve jažice i isprazniti ih s pumpom, ponoviti dva puta.
12. Dodati 100 μL pufera za test u sve jažice.
13. Otpipetirati 50 μL otopine streptavidin-PE u sve jažice (uključujući slijepu).
14. Pokriti ploču s adhezivnim filmom, zamotati u aluminijsku foliju za zaštitu od svjetla i inkubirati 1 sat na 500 rpm na tresilici na sobnoj temperaturi.
15. Nakon 1 sata ukloniti adhezivni film i isprazniti jažice s pumpom.
16. Dodati 100 μL pufera za test u sve jažice i isprazniti ih s pumpom u dva navrata.
17. Otpipetirati 200 μL pufera za test u sve jažice.
18. Promiješati dobro sadržaj svake jažice s pipetom i prebaciti 200 μL iz svake jažice u epruvetu za protočni citometar.
19. Dodati u svaku epruvetu još 300 μL pufera za test, da ukupno ima 500 μL u epruveti.
20. Analizirati na protočnom citometru.

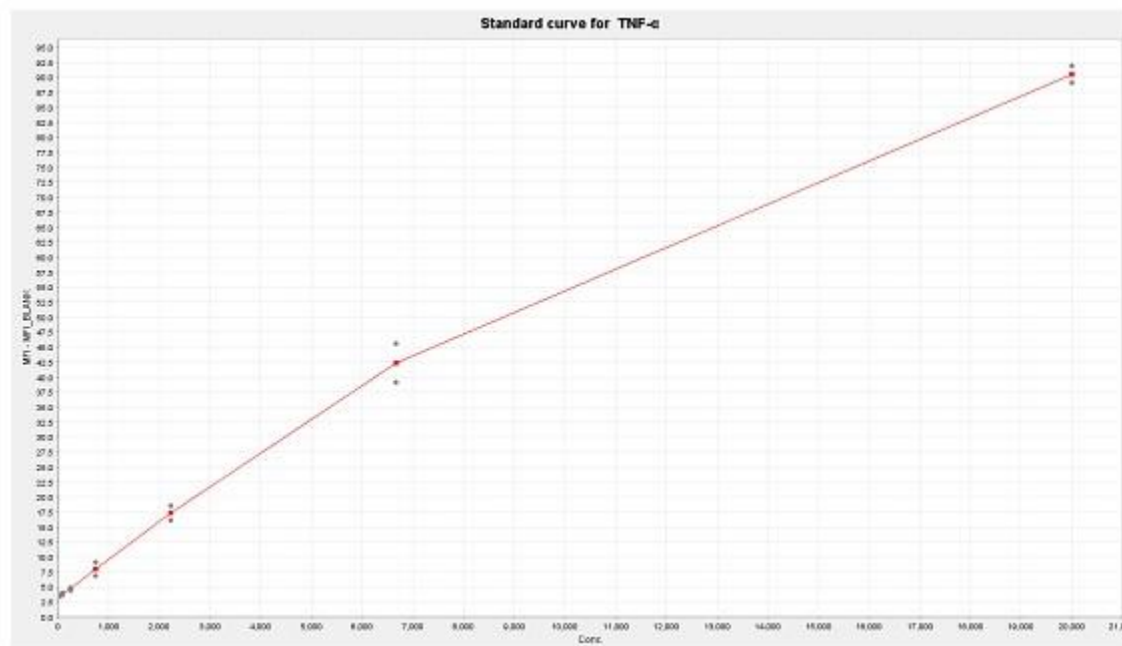
Podaci o intenzitetu fluorescencije dobiveni mjerenjem na protočnom citometru obrađeni su u programu: *FlowCytomix Pro Software*, *eBioScience*, (<http://www.ebioscience.com/resources/flowcytomixsoftware/downloads/full-version.htm>), te su dobivene koncentracije citokina. Standardi su u oba korištena kita rađeni u duplikatu, te su krivulje prilagođene da slijede linearnu funkciju.

Za svaki pojedini izmjereni citokin na protočnom citometru napravljene su kalibracijske krivulje. Zbog velikog broja kalibracijskih krivulja izdvojene su samo dvije kalibracijske krivulje (za IL-1 β i TNF- α) kao primjer i prikazane su na Slici 8. i Slici 9.



Slika 8. Primjer kalibracijske krivulje za IL-1 β na protočnom citometru s Human Th1/Th2 11plex Kit FlowCytomix; krivulja dobivena u programu za obradu podataka s protočnog citometra FlowCytomix Pro Software.

IL- interleukin; MFI - srednji intenzitet fluorescencije (*engl. mean fluorescence intensity*)



Slika 9. Primjer kalibracijske krivulje za TNF- α na protočnom citometru s Human Th1/Th2 11plex Kit FlowCytomix; krivulja dobivena u programu za obradu podataka s protočnog citometra FlowCytomix Pro Software.

TNF – čimbenik tumorske nekroze; MFI - srednji intenzitet fluorescencije (*engl. mean fluorescence intensity*)

3.2.6 Određivanje apoptoze i nekroze

3.2.6.1 Određivanje broja apoptoznih i nekroznih stanica s Aneksin-V-FITC i CD45-antitijelom

Apoptoza je karakterizirana kondenzacijom kromatina, smanjenjem veličine stanice i kidanjem DNA endonukleazama u fragmente nukleosomalne veličine. Osim morfoloških promjena tijekom apoptoze, dolazi do narušavanja strukture stanične membrane i do translokacije fosfatidilserina (PS) na vanjsku stranu stanične membrane. Izlaganje PS-a na staničnoj površini pruža jednostavan uvid u detekciju stanica koje se nalaze u procesu apoptoze.

Aneksin V (Mr 36 kDa) je član porodice aneksina, ima visoki afinitet prema fosfolipidnom dvosloju koji sadrži PS. Kada je PS izložen na vanjskoj površini stanične membrane, aneksin V se veže s visokim afinitetom za PS. Konjugati fluorokroma aneksina V se mogu koristiti za praćenje promjena u asimetriji fosfolipida stanične membrane i time omogućavaju detekciju stanica koje su u apoptozi. Eksternalizacija PS se pojavljuje prije promjena u jezgri koje su povezane s apoptozom. Stoga se ApoScreen Aneksin V-FITC kit može koristiti za detekciju stanica koje su u ranoj fazi apoptotičkog procesa za razliku od testova koji se temelje na fragmentaciji DNA.

ApoScreen Aneksin V-FITC apoptoza kit sadrži fluoresceinom-obilježeni aneksin V (Aneksin V-FITC) zajedno s propidij-jodidom (PI) za otkrivanje subpopulacija stanica koje su u apoptozi i nekrozi. Kako stanična membrana postaje sve propusnija tijekom kasnijih stadija procesa apoptoze, PI može prodirati kroz staničnu membranu i vezati se na staničnu DNA i otkriti stanice koje su izgubile integritet stanične membrane tijekom nekroznog procesa. Kada su stanice dvostruko obojane s Aneksin V-FITC i PI, mogu se vidjeti tri različite populacije stanica:

- a) žive stanice koje se ne boje niti s Aneksin V-FITC-om ili PI-om,
- b) nekrozne stanice koje se boje s oba reagensa,
- c) apoptozne stanice koje se boje samo s Aneksin V-FITC-om.

Uzorci krvi analizirani su na protočnom citometru Cytomics FC 500, Beckman Coulter, 2 lasera, 5 boja.

Kako bi se razlikovala populacija leukocita primjenjeno je i bojanje/obilježavanje populacije leukocita s CD45-PC7 antitijelom (PC7- fikoeritrin-cijanin 7). Antitijelo konjugirano s

fluorokromom omogućilo je identifikaciju stanica koje imaju CD45 antigen. CD45 antigen je eksprimiran na leukocitima i smatra se pan-leukocitnim biljekom.

Liza eritrocita se radila s 1,2 % mravljom kiselinom (1,2 mL/L; *Kemika*), a leukociti su stabilizirani sa pripremljenim reagensom sljedećeg sastava: Na_2CO_3 6,0 g/L (*Kemika*); NaCl 14,5 g/L (*Kemig d.o.o.*); Na_2SO_4 31,3 g/L (*Kemika*) na aparatu TQ Prep, Beckman Coulter.

Postupak određivanja broja apoptoznih i nekroznih stanica, modificiran za perifernu punu krv uzetu na K₃EDTA s lizom eritrocita:

METODA:

Epruveta – CD45-PC7 + Annexin V –FITC + stanice + PI

1. Otpipetirati punu krv – 500 µL.
2. Lizirati eritrocite s 1,2 % mravljom kiselinom na aparatu za lizu eritrocita TQ Prep, tvrtke Beckman Coulter.
3. Izvrtiti na 500 g, tijekom 5 minuta, baciti supernatant.
4. Dodati 1 mL hladnog PBS-a na talog.
5. Centrifugirati na 500 g, tijekom 5 minuta, baciti supernatant.
6. Dodati 1 mL hladnog PBS-a na talog.
7. Centrifugirati na 500 g, tijekom 5 minuta, baciti supernatant.
8. Na talog dodati 500 µL Annexin-V-vezajućeg pufera 10x – stanice su spremne za analizu.
9. Dodati 10 µL CD45-PC7 antitijela u praznu epruvetu.
10. Dodati 10 µL Annexin V –FITC-a u istu epruvetu.
11. Dodati po 100 µL stanica.
12. Lagano promiješati i inkubirati 15 minuta u hladnjaku na 4 °C, umotano u foliju, zaštićeno od svjetla.
13. Dodati 380 µL hladnog Annexin-V-vezajućeg pufera 10x.
14. Dodati 10 µL PI-a. Lagano promiješati i inkubirati 15 minuta u hladnjaku na 4 °C, umotano u foliju, zaštićeno od svjetla.
15. Analizirati na protočnom citometru.

3.2.6.2 Određivanje stanica u apoptozi TUNEL metodom

Dekstran 500000 dodan je na uzorke pune svježe periferne venske krvi uzete s antikoagulansom K₃EDTA. Na sobnoj temperaturi, eritrociti sedimentiraju prvi, a leukociti ostaju u suspenziji. Izolirani i pročišćeni leukociti su korišteni za detekciju procesa apoptoze. TUNEL test je proveden s dUTP- fluorescein izotiocijanatom (FITC), prema preporuci proizvođača reagensa (*In Situ Cell Death Detection Kit-Fluorescein; Roche Applied Science*). Stanice su prvo fiksirane s 4 % paraformaldehidom u PBS puferu i fragmentirana DNA stanica u apoptozi je obilježena putem katalitičke inkorporacije FITC-obilježenog dUTP-a na 3'-OH kraju, korištenjem deoksinukleotidil-transferaze. dUTP-FITC obilježena DNA je vizualizirana korištenjem fluorescentnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus).

3.2.7 Statistička analiza

Statistička obrada podataka rađena je u programu MedCalc (MedCalc statistical software, verzija 6.14.). Rezultati su prikazani odgovarajućim mjerama središnjice i rasapa, ovisno o veličini uzorka i normalnosti raspodjele. Normalnost raspodjele podataka ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Podaci koji slijede normalnu raspodjelu prikazani su srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom (SD), a podaci koji ne pokazuju normalnu raspodjelu su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. Obzirom na raspodjelu podaci su testirani na razliku parametrijskim ili neparametrijskim testovima za nezavisne uzorke. Korišten je Studentov t-test za normalnu raspodjelu podataka, a Mann-Whitney-ev test za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu, kada se radilo o usporedbi dvije skupine. Za testiranje razlike u više od dvije skupine korištena je analiza varijance - ANOVA (*engl. analysis of variance*) test za normalnu raspodjelu podataka, a Kruskal-Wallis-ov test za podatke koji ne slijede normalnu raspodjelu. Kategorijske varijable ispitane su u tablicama frekvencije i χ^2 -testom. Spearmanov koeficijent korelacije korišten je za usporedbu izmjerenih vrijednosti citokina i njihovu međusobnu korelaciju. Statistički značajnom razlikom smatrane su sve razlike i povezanosti uz $P < 0,05$.

Hijerarhijska klaster analiza (*engl. hierarchical cluster analysis, HCA*) za ispitivanje obrazaca citokina rađena je u programu NCSS. Hijerarhijska klaster analiza je nova metoda koja je do sada korištena uglavnom u studijama ekspresije genskog profila (141). Međutim, nedavno su neke skupine autora ukazale na mogućnost korištenja hijerarhijske klaster analize za otkrivanje određenih obrazaca citokina u populacijama bolesnika (142–144).

4. REZULTATI

4.1 Prikaz rezultata ovisno o terapiji statinima

4.1.1 Citokini

Bolesnici s KOPB-om (N=100) su podijeljeni u dvije skupine, bolesnici bez terapije (N=66) i bolesnici koji su primali statine (N=34). Bolesnici na terapiji sa statinima primali su uglavnom simvastatin, rosuvastatin i atrovastatin u niskim dozama (20-40 mg) u večernjim satima dulje od godine dana.

Prikaz osnovnih karateristika bolesnika kao što su spol, dob, FEV₁, ITM, pušačke godine, komorbiditeti i kombinirana GOLD klasifikacija (prema revidiranoj GOLD klasifikaciji iz 11/2016) prikazana je u Tablici 4. Za svaki uzorak plazme bolesnika (N=100) napravljena su mjerenja svih 11 citokina. Primjer grafičkog prikaza rezultata za citokine za jednog bolesnika sa protočnog citometra prikazan je na slikama 10., 11. i 12.

Citokini IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α pokazali su statistički značajno smanjenje koncentracije u bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima u odnosu na bolesnike s KOPB bez terapije statinima (Tablica 5.).

IL-5 i IL-6 nisu pokazali statistički značajnu razliku između ovih dviju skupina, iako je vidljivo povećanje koncentracije obaju citokina kod skupine bolesnika na terapiji statinima u odnosu na ispitanike koji nisu na terapiji statinima. Izmjerene koncentracije za IFN- γ i TNF- β su uglavnom manje od praga osjetljivosti analitičkog postupka. Grafički prikaz usporedbe vrijednosti citokina za svaki pojedini citokin u skupinama bolesnika s KOPB-om bez terapije i s terapijom statinima prikazana je na slikama 13. do 21.

Tablica 4. Osnovne demografske karakteristike bolesnika po skupinama s/bez terapije statinima prema revidiranoj GOLD klasifikaciji iz 2017. (7)

Parametri	KOPB bolesnici bez terapije statinima	KOPB bolesnici na terapiji statinima	P vrijednost
Broj bolesnika (N)	66	34	
Spol (žene/muškarci)	19/47	10/24	0,867
Dob bolesnika (godine)	67 (52-82)	68 (53-84)	0,817
FEV₁ (% očekivanog)	52,9 ± 17,9	53,9 ± 15,2	0,784
mMRC (0-4)	8/32/13/1/4	0/12/14/6/1	0,008
ITM (kg/m²)	26,3 ± 4,6	30,7 ± 5,4	0,0001
Pušenje (nepušači/bivši/pušači)	2/41/23	1/24/9	0,456
Pušačke navike (pakiranja/godini)	40,4 ± 21,9	47,6 ± 28,2	0,170
Komorbiditeti			
Hipertenzija (da/ne)	37/29	29/5	0,007
Dijabetes mellitus (da/ne)	3/63	9/25	0,004
Osteoporoza (da/ne)	17/49	1/33	0,011
GOLD klasifikacija, kombinirana			
A	16	12	0,232
B	23	14	
C	17	2	
D	10	6	

Rezultati su prikazani sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom, dob bolesnika je prikazana s medijanom (minimum-maksimum); P vrijednost je izračunata s frekvencijskom tablicom i χ^2 -testom za nominalnu ljestvicu podataka, Studentov t-test korišten je za podatke s omjernom ljestvicom i normalnom razdiobom.

Statistički značajni rezultati imaju $P < 0,05$ i označeni su s *

FEV₁- forsirani izdisajni volumen u 1 sekundi; mMRC- modificirana skala britanskog Medicinskog istraživačkog vijeća (*engl. modified British Medical Research Council scale*); ITM- indeks tjelesne mase

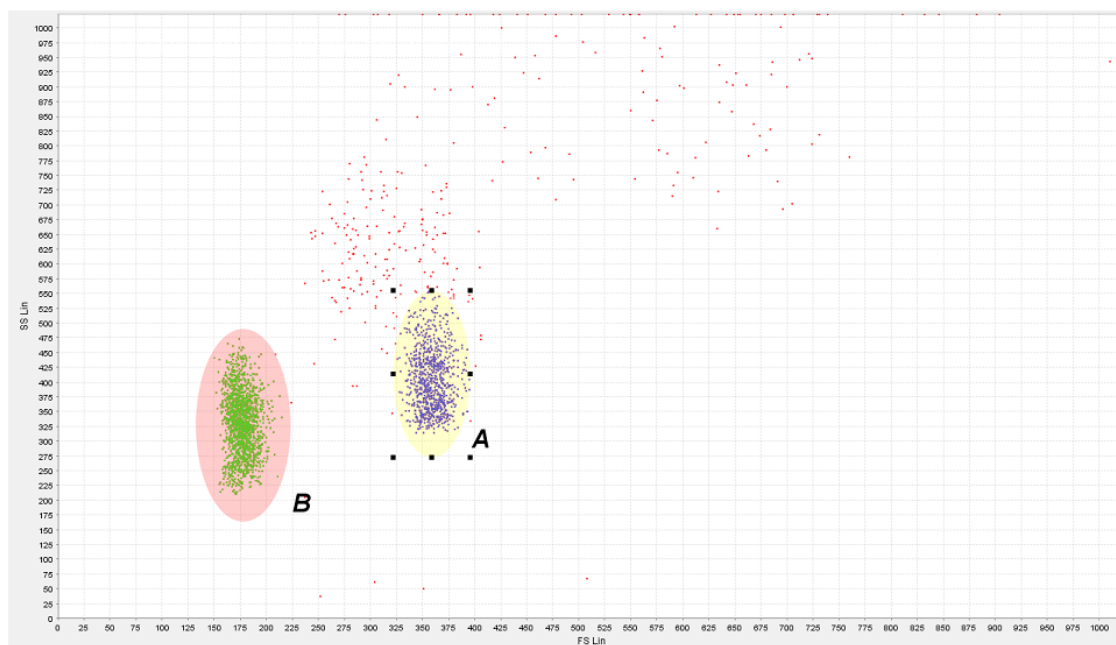
Tablica 5. Koncentracija citokina po skupinama bolesnika s KOPB-om ovisno o terapiji statinima

Citokini	KOPB bolesnici bez terapije statinima	KOPB bolesnici na terapiji statinima	P vrijednost
IL-1β (ng/L)	21,16 (20,08 – 23,09)	9,51 (0,00 – 22,25)	0,013*
IL-2 (ng/L)	22,50 (19,64 – 24,05)	8,65 (0,00 – 24,92)	0,028*
IL-4 (ng/L)	17,33 (15,24 – 18,68)	7,66 (0,00 – 18,41)	0,017*
IL-5 (ng/L)	12,05 (9,34 – 17,03)	26,91 (10,01 – 181,92)	0,099
IL-6 (ng/L)	2,81 (0,69 – 7,22)	4,08 (0,00 – 7,76)	0,609
IL-8 (ng/L)	29,40 (6,40 – 402,14)	3,58 (0,00 – 208,70)	0,006*
IL-10 (ng/L)	18,14 (15,75 – 20,91)	0,00 (0,00 – 17,65)	0,001*
IL-12p70 (ng/L)	4,77 (4,10 – 6,02)	2,20 (0,00 – 5,65)	0,048*
IFN-γ (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/
TNF-α (ng/L)	16,99 (12,79 – 21,27)	0,00 (0,00 – 19,54)	0,001*
TNF-β (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/

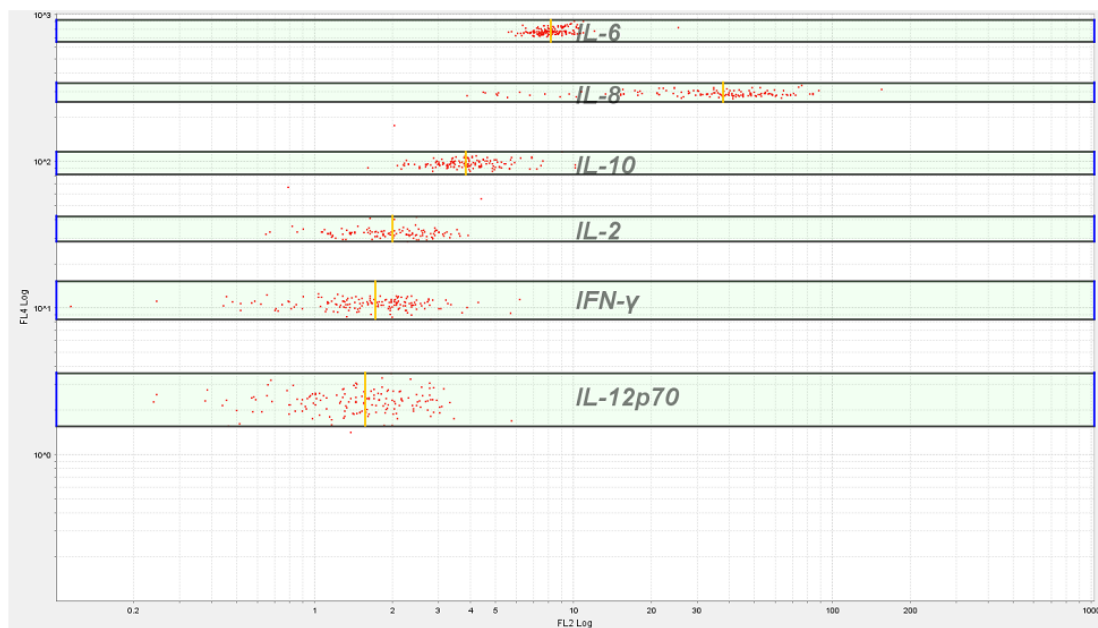
Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom, jer ne slijede normalnu razdiobu (testirano Kolmogorov-Smirnov testom); P vrijednost je izračunata s Mann-Whitney-evim testom za nezavisne uzorke zbog nenormalne razdiobe podataka.

Statistički značajni rezultati imaju $P < 0,05$ i podebljani su te označeni s *

IL- interleukin; IFN- γ - interferon- γ ; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; TNF- β - čimbenik tumorske nekroze- β



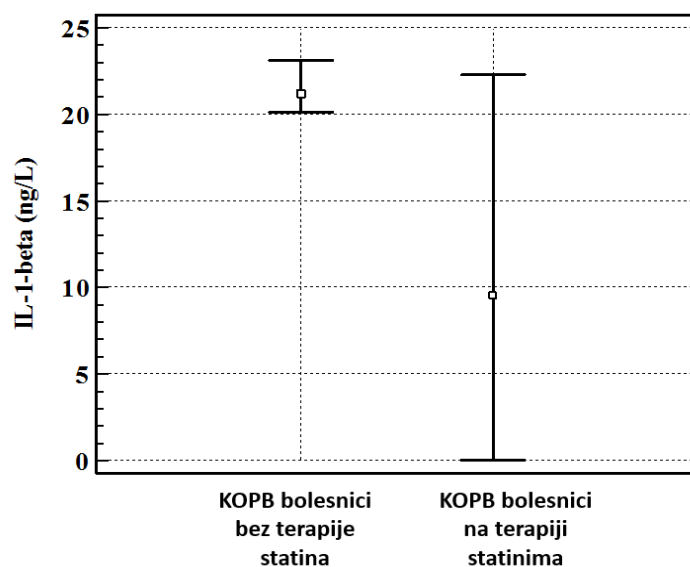
Slika 10. Točkasti prikaz mjerenja koncentracije citokina na protočnom citometru za uzorak plazme bolesnika. Skupina A i B pokazuje dva seta kuglica (*engl. beads*) različitih veličina koje se koriste u FlowCytomix-u (veličina A: 5 μm , veličina B: 4 μm). Populacija kuglica je obložena sa specifičnim antitijelima za citokine; FS – *forward scatter*, SC – *side scatter*.



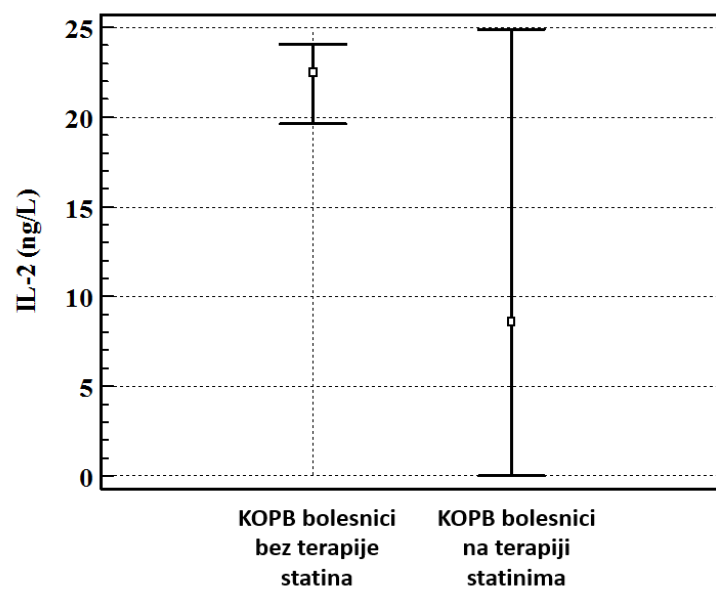
Slika 11. Gate R1 pokazuje populaciju kuglica A obloženih sa specifičnim antitijelima za sljedeće citokine: IL-12 p70, IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-8, IL-6.



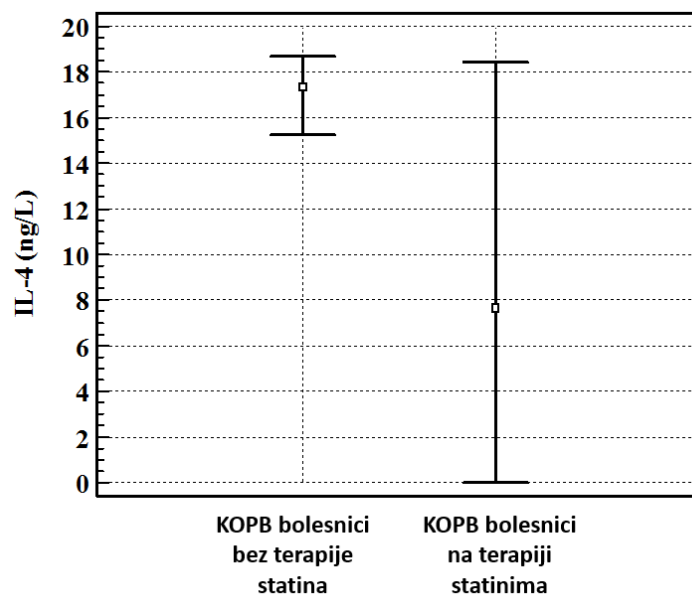
Slika 12. Gate R2 pokazuje populaciju kuglica B obloženih sa specifičnim antitijelima za sljedeće citokine: IL-4, IL-5, IL-1 β , TNF- α , TNF- β .



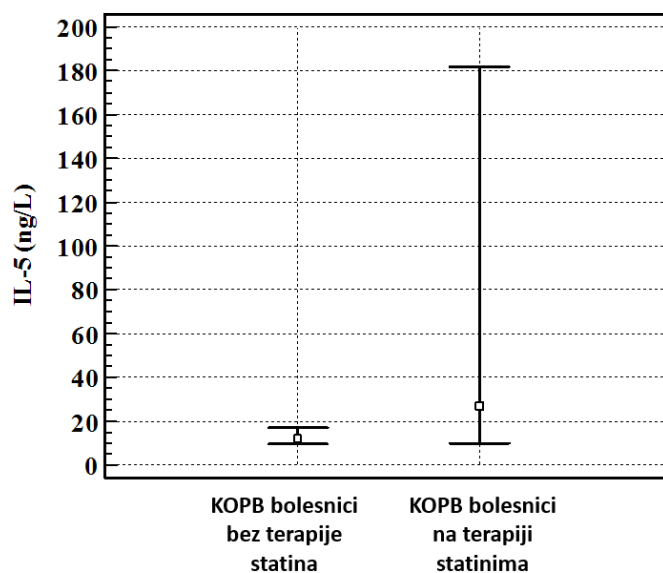
Slika 13. Koncentracija IL-1 β u ispitanim skupinama bolesnika.



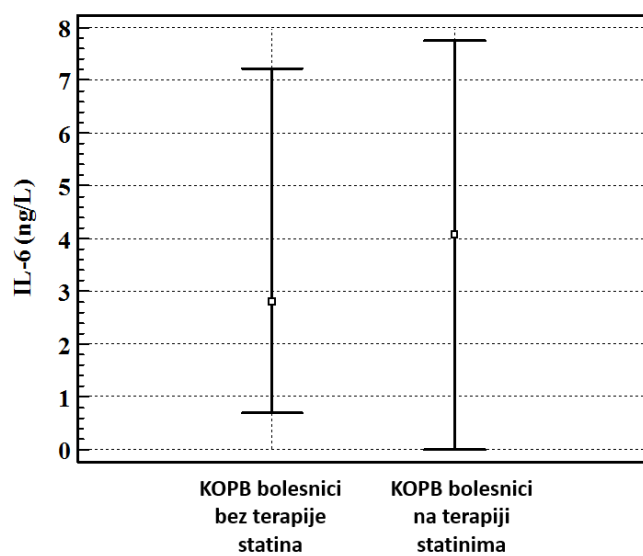
Slika 14. Koncentracija IL-2 u ispitanim skupinama bolesnika.



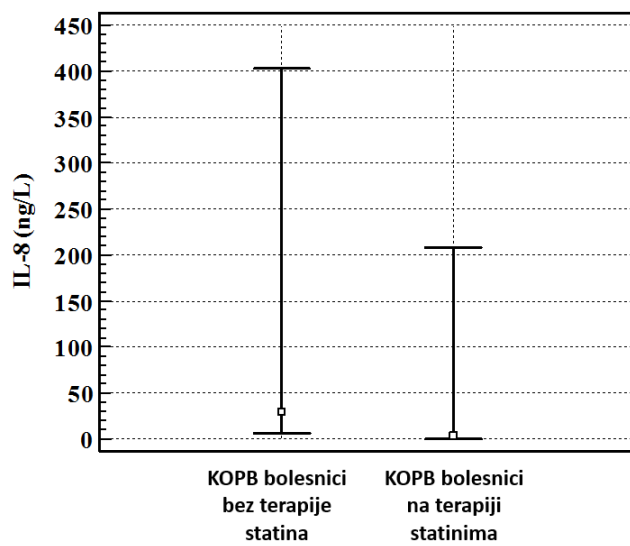
Slika 15. Koncentracija IL-4 u ispitanim skupinama bolesnika.



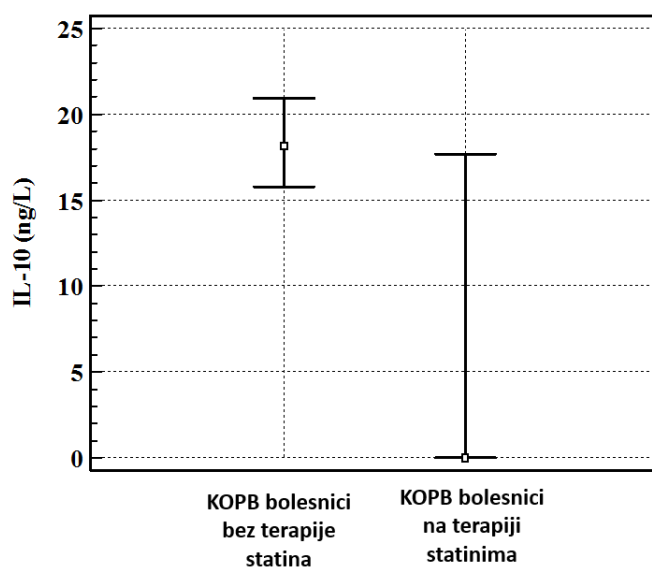
Slika 16. Koncentracija IL-5 u ispitanim skupinama bolesnika.



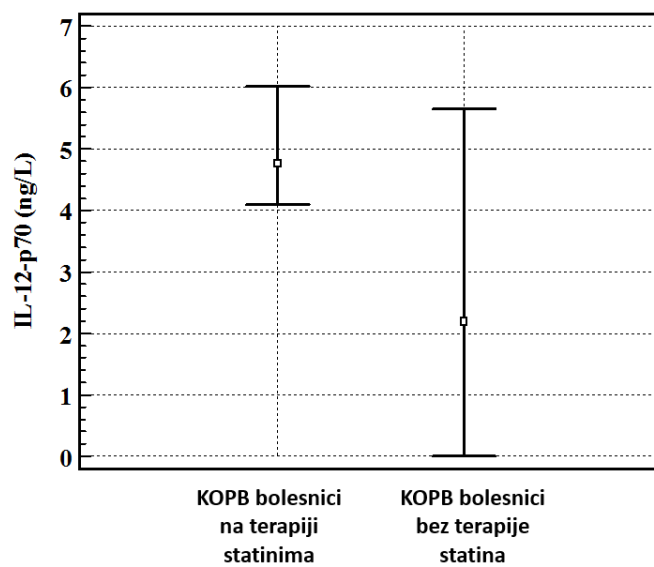
Slika 17. Koncentracija IL-6 u ispitanim skupinama bolesnika.



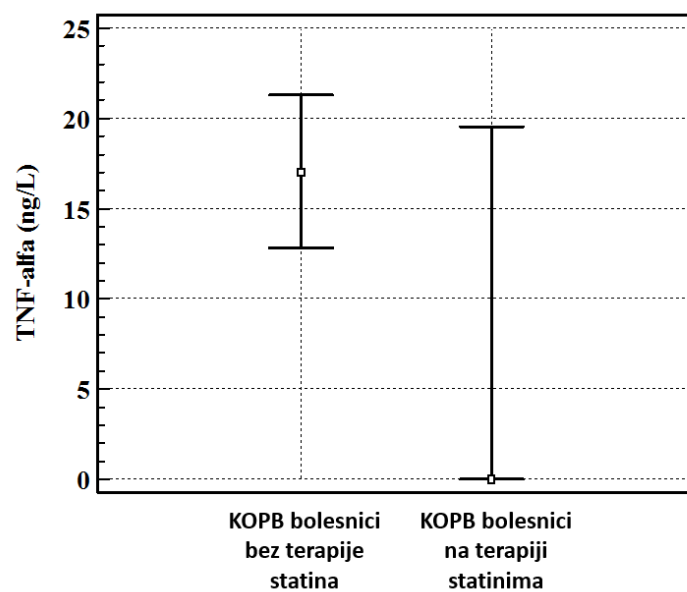
Slika 18. Koncentracija IL-8 u ispitanim skupinama bolesnika.



Slika 19. Koncentracija IL-10 u ispitanim skupinama bolesnika.



Slika 20. Koncentracija IL-12p70 u ispitanim skupinama bolesnika.



Slika 21. Koncentracija TNF- α u ispitanim skupinama bolesnika.

4.1.2 Biokemijski i hematološki parametri

U svih bolesnika s KOPB-om izmjereni su sljedeći biokemijski parametri u serumu: kolesterol, trigliceridi, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, CRP, glukoza, ureja, kreatinin, natrij, kalij, kloridi, ukupni bilirubin, AST, ALT, GGT, ALP, LD, CK, amilaza, ukupni proteini, albumin, mokraćna kiselina, željezo i UIBC.

Prikaz izmjerenih biokemijskih parametara bolesnika podijeljenih u dvije skupine ovisno o terapiji statinima i statistička usporedba nalazi se u Tablici 6. Koncentracije kolesterola, HDL-kolesterola i LDL-kolesterola u serumu bolesnika na terapiji statinima su bile statistički značajno smanjenje u odnosu na skupinu koja nije na terapiji statinima, što je bilo i očekivano. Iako očekivano, koncentracija CRP-a nije pokazala statistički značajnu razliku među skupinama bolesnika. Značajna razlika u serumu ispitanika ovisno o terapiji statinima je pronađena za glukozu i mokraćnu kiselinu, s povišenim vrijednostima kod ispitanika na terapiji statinima. Vrijednosti za albumin u serumu su pokazale statistički značajno smanjenje u bolesnika na terapiji statinima. Vrijednosti za željezo nisu bile statistički značajno različite dok je vrijednost za nezasićeni kapacitet vezanja željeza bila statistički značajno povećana u bolesnika na statinima, a saturacija željeza statistički značajno snižena. Enzimi nisu pokazali statistički značajnu razliku, kao ni bilirubin, ureja, kreatinin i elektroliti.

Nadalje, za sve bolesnike je također izračunata eGFR s MDRD2 jednadžbom, s obzirom na dobivene statistički značajne razlike u vrijednostima albumina i mokraćne kiseline, da se ispita postoje li razlike u eGFR-u u tim dvjema skupinama. Dobiveni rezultati su također prikazani u Tablici 6.

Zbirni rezultati prikazani mjerama srednje vrijednosti i rasapa za kompletnu i diferencijalnu krvnu sliku nalaze se u Tablici 7. sa pripadajućim izračunom statističke značajnosti. Rezultati za KKS i diferencijalnu krvnu sliku (DKS) nisu pokazali značajnu razliku između skupina bolesnika bez obzira na terapiju statinima.

Tablica 6. Koncentracija osnovnih biokemijskih parametara po skupinama bolesnika s KOPB-om ovisno o terapiji sa statinima

Biokemijski parametri	KOPB bolesnici bez terapije statinima	KOPB bolesnici na terapiji statinima	P vrijednost
Kolesterol (mmol/L)	6,0 ± 1,3	4,5 ± 1,1	< 0,0001*
HDL-kolesterol (mmol/L)	1,7 ± 0,5	1,3 ± 0,5	0,0005*
LDL-kolesterol (mmol/L)	3,3 ± 1,0	2,5 ± 0,8	0,0001*
Trigliceridi (mmol/L)	1,3 (0,9 – 1,8)	1,4 (1,0 – 1,7)	0,853
CRP (mg/L)	3,03 (1,42 – 5,76)	3,09 (1,70 – 7,04)	0,543
Glukoza (mmol/L)	5,8 (5,4 – 6,7)	6,3 (5,7 – 7,4)	0,037*
Ureja (mmol/L)	6,1 (4,7 – 6,6)	6,3 (4,9 – 7,7)	0,312
Kreatinin (μmol/L)	92,2 ± 15,9	96,8 ± 18,8	0,200
Natrij (mmol/L)	140,3 ± 2,1	140,9 ± 3,4	0,289
Kalij (mmol/L)	4,3 ± 0,4	4,3 ± 0,4	0,770
Kloridi (mmol/L)	102,2 ± 3,0	101,8 ± 3,6	0,507
Bilirubin ukupni (μmol/L)	11,3 ± 4,6	12,9 ± 4,7	0,107
AST (U/L)	20,5 ± 6,28	21,4 ± 9,2	0,593
ALT (U/L)	17,0 (14,0 – 23,0)	16,5 (13,0 – 25,0)	0,956
GGT (U/L)	28,0 (18,0 – 44,0)	29,0 (20,0 – 51,0)	0,346
LD (U/L)	180,7 ± 40,8	169,8 ± 45,7	0,227
CK (U/L)	93,0 (71,0 – 141,0)	95,5 (66,0 – 142,0)	0,777
ALP (U/L)	77,1 ± 23,5	71,9 ± 21,0	0,279
AMS (U/L)	68,1 ± 24,0	68,6 ± 34,4	0,934
Ukupni proteini (g/L)	72,3 ± 4,1	72,5 ± 5,1	0,872
Albumin (g/L)	47,3 ± 3,1	45,5 ± 4,2	0,019*
Mokraćna kiselina (μmol/L)	354,6 ± 101,8	397,4 ± 84,7	0,039*
Željezo (μmol/L)	17,0 ± 6,4	14,9 ± 4,6	0,092
UIBC (μmol/L)	39,4 ± 9,7	43,6 ± 9,4	0,041*
Saturacija željeza (%)	30,6 ± 11,3	25,9 ± 8,2	0,033*

eGFR (ml/min/1,73 m ²)			
> 60	N=53	N=27	0,874
≤ 60	N=13	N=7	

Rezultati su prikazani sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom, ovisno o tome slijede li normalnu razdiobu ili ne (testirano Kolmogorov-Smirnov-im testom); P vrijednost je izračunata Studentovim T-testom za nezavisne uzorke kod podataka koji slijede normalnu razdiobu podataka odnosno Mann-Whitney-evim testom za nezavisne uzorke koji slijede nenormalnu razdiobu podataka.

Statistički značajni rezultati imaju $P < 0,05$ i podebljani su te označeni sa *

LDL- lipoproteini niske gustoće; HDL- lipoproteini visoke gustoće; AST- aspartat-aminotransferaza; ALT- alanin-aminotransferaza; GGT- γ -glutamil-transferaza; LD- laktat-dehidrogenaza; CK- kreatin-kinaza; ALP- alkalna fosfataza; AMS- amilaza; CRP- C-reaktivni protein; UIBC- nezasićeni kapacitet vezanja željeza (*engl. unsaturated iron binding capacity*); eGFR- procijenjena glomerularna filtracija (*engl. estimated glomerular filtration rate*)

Tablica 7. Hematološki parametri, KKS i DKS

Parametri	KOPB bolesnici bez terapije statinima	KOPB bolesnici na terapiji statinima	P vrijednost
Broj bolesnika (N)	64	20	
Leukociti ($\times 10^9/L$)	$7,7 \pm 2,0$	$7,8 \pm 2,3$	0,879
Neutrofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	$4,9 \pm 1,8$	$5,1 \pm 1,9$	0,804
Limfociti ($\times 10^9/L$)	$1,9 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,6$	0,376
Monociti ($\times 10^9/L$)	0,6 (0,5 – 0,8)	0,7 (0,6 – 0,8)	0,353
Eozinofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	0,2 (0,1 – 0,3)	0,2 (0,1 – 0,3)	0,564
Bazofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	0,00 (0,00-0,10)	0,00 (0,00-0,10)	0,781
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	$4,73 \pm 0,41$	$4,76 \pm 0,47$	0,739
Hemoglobin (g/L)	$146,5 \pm 12,8$	$144,7 \pm 14,6$	0,645
Hematokrit (L/L)	$0,440 \pm 0,036$	$0,435 \pm 0,039$	0,590
MCV (fL)	$93,3 \pm 4,3$	$91,5 \pm 3,9$	0,105
MCH (pg)	$31,0 \pm 1,7$	$30,4 \pm 1,7$	0,177
MCHC (g/L)	$332,4 \pm 5,6$	$332,4 \pm 8,6$	0,988
RDW (%)	$13,8 \pm 0,8$	$14,2 \pm 0,9$	0,075
Trombociti ($\times 10^9/L$)	$225,2 \pm 61,8$	$203,7 \pm 56,1$	0,169
MPV (fL)	$9,16 \pm 0,98$	$9,18 \pm 0,98$	0,965

Rezultati su prikazani sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom te sa medijanom i interkvartilnim rasponom, ovisno o tome slijede li podaci normalnu razdiobu ili ne (testirano Kolmogorov-Smirnov-im testom); P vrijednost je izračunata Studentovim T-testom ili Mann-Whitney-evim testom za nezavisne uzorke ovisno o tome slijede li normalnu razdiobu ili ne

KKS- kompletna krvna slika; DKS- diferencijalna krvna slika; MCV- srednji volumen eritrocita (*engl. mean corpuscular volume*); MCH- prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu (*engl. mean corpuscular hemoglobin*); MCHC- prosječna koncentracija hemoglobina u 1 L eritrocita (*engl. mean corpuscular hemoglobin concentration*); RDW- raspodjela eritrocita po volumenu (*engl. red cell distribution width*); MPV – srednji volumen trombocita (*engl. mean platelet volume*)

4.1.3 Korelacija i hijerarhijska klaster analiza citokina

Tablica 8. prikazuje Spearmanove koeficijente korelacije za izmjerene citokine u plazmi svih bolesnika s KOPB-om. Koncentracija IL-1 β je pokazala dobru korelaciju s IL-2, IL-10 i IL-12p70, a izvrsnu s IL-4 i TNF- α . Koncentracija IL-2 je pokazala dobru korelaciju s IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-12p70 i TNF- α . Koncentracija IL-4 je pokazala dobru korelaciju s IL-2, IL-10, IL-12p70 i TNF- α i izvrsnu korelaciju s IL-1 β . Koncentracija IL-5 je pokazala slabu korelaciju samo s IL-6. Koncentracija IL-8 je pokazala slabu korelaciju s IL-10 i TNF- α . Koncentracija IL-10 je pokazala slabu korelaciju s IL-8, a dobru korelaciju s IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12p70 i TNF- α . Koncentracija IL-12p70 je pokazala dobru korelaciju s IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10 i TNF- α . Koncentracija TNF- α je pokazala slabu korelaciju s IL-8, dobru korelaciju s IL-2, IL-4, IL-10 i IL-12p70, a izvrsnu s IL-1 β .

Hijerarhijskom klaster analizom su grafički prikazani obrasci izmjerenih citokina u plazmi svih 100 bolesnika s KOPB-om (Slika 22.). Naime, uvidom u pojedinačno izmjerene vrijednosti citokina za pojedinoga bolesnika s KOPB-om, bez obzira na terapiju statinima, vidljivo je istovremeno povećanje ili sniženje koncentracije različitih citokina. Prisutno je nekoliko obrazaca za koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om i istovremeno povećanje koncentracije pojedinih citokina (ko-elevacija). Hijerarhijska klaster analiza omogućava grafički prikaz odnosno svrstavanje pojedinih bolesnika u homogene skupine na temelju koncentracije citokina, odnosno po vrijednostima citokina se spajaju najslikličiji bolesnici te nastaju odgovarajući obrasci citokina. Tako se iz slike vidi da postoji 5 većih skupina odnosno 5 obrazaca za vrijednosti citokina kod bolesnika s KOPB-om u ovom istraživanju. Obrazac A uglavnom pokazuje umjerene koncentracije citokina: IL-12p70, IL-2, TNF- α , IL-4, IL-1 β , IL-10 i IL-6 te manje koncentracije IL-8 i IL-5. Obrazac B pokazuje umjerene koncentracije citokina: IL-12p70, IL-2, TNF- α , IL-4, IL-1 β , IL-10 i IL-5 te veće koncentracije IL-8, dok su koncentracije IL-6 niske. Obrazac C pokazuje niske koncentracije citokina IL-12p70, IL-2, TNF- α , IL-4, IL-1 β i IL-10, a povećane koncentracije IL-8, IL-6 i IL-5. Obrazac D pokazuje niske koncentracije svih mjenjenih citokina, u toj skupini se uglavnom nalaze bolesnici na terapiji statinima. Obrazac E pokazuje umjerene koncentracije citokina: IL-12p70, IL-2, TNF- α , IL-4, IL-1 β , IL-10, IL-6 i IL-5, ali i povećane koncentracije IFN- γ .

Testiranje korelacije FEV₁ (%) sa svim izmjerenim citokinima nije dalo statistički značajne rezultate za niti jedan izmjereni citokin (P>0.05), te sukladno tome rezultati za Spearmanov koeficijent korelacije nisu prikazani. Vrijednosti CRP-a i FEV₁ (%) također nisu pokazale statistički značajnu korelaciju (P>0,05). Vrijednosti FEV₁ (%) i mokraćne kiseline u serumu također nisu pokazale statistički značajnu korelaciju (P>0.05).

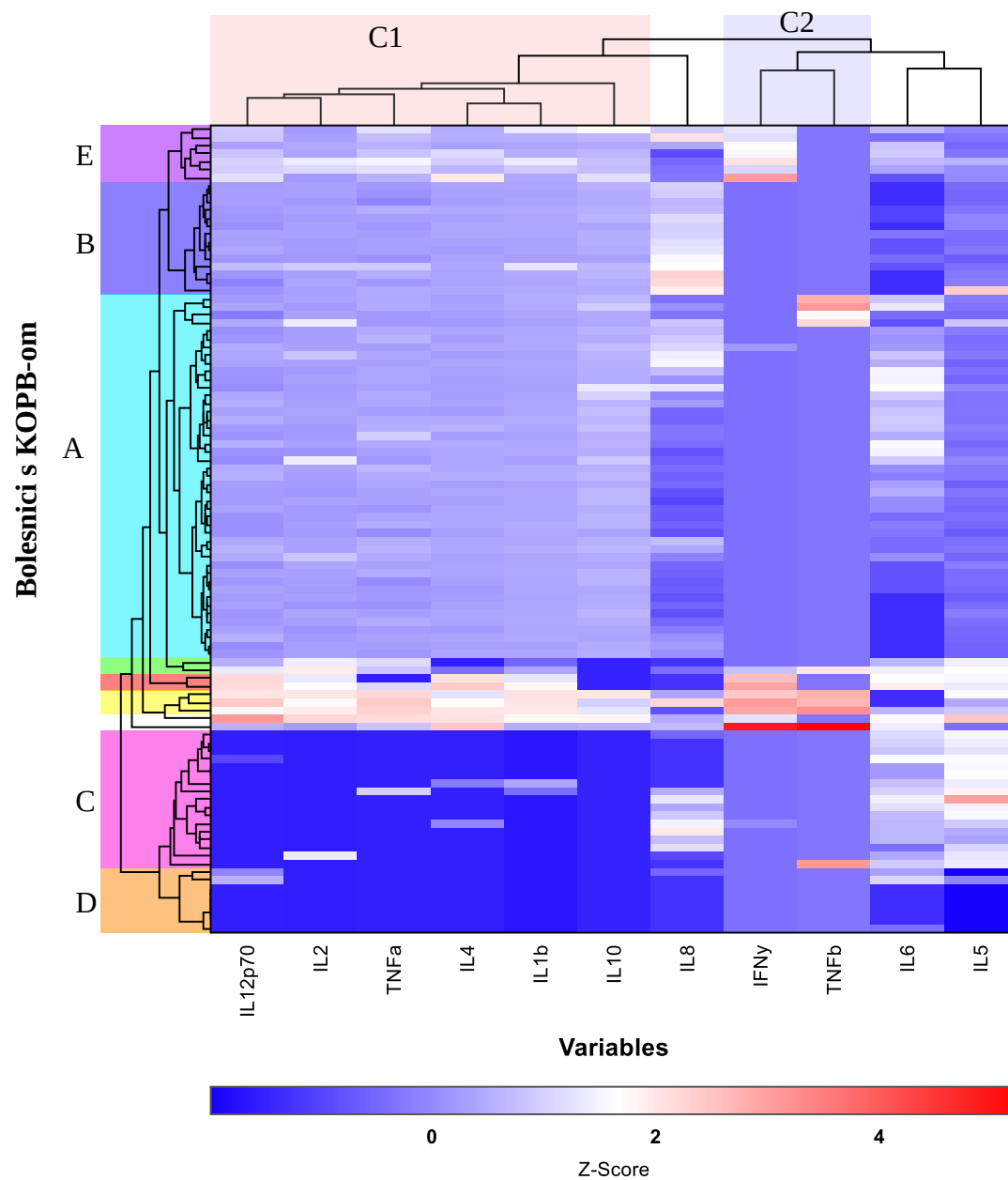
Tablica 8. Međusobna korelacija koncentracije citokina kod svih bolesnika s KOPB-om

Citokini	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	TNF- α
IL-1β	/	0,602	0,859	/	/	/	0,674	0,732	0,754
IL-2	0,602	/	0,607	/	/	/	0,527	0,644	0,633
IL-4	0,859	0,607	/	/	/	/	0,730	0,713	0,695
IL-5	/	/	/	/	0,457	/	/	/	/
IL-6	/	/	/	0,457	/	/	/	/	/
IL-8	/	/	/	/	/	/	0,299	/	0,284
IL-10	0,674	0,527	0,730	/	/	0,299	/	0,602	0,692
IL-12p70	0,732	0,644	0,713	/	/	/	0,602	/	0,715
TNF-α	0,754	0,633	0,695	/	/	0,284	0,692	0,715	/

U tablici su prikazani Spearman-ovi koeficijenti korelacije; podebljani su koeficijenti korelacije koji pokazuju jako dobru povezanost;

Prikazani su samo statistički značajni koeficijenti korelacije koji imaju P<0,05

IL- interleukin; IFN- γ - interferon- γ ; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; TNF- β - čimbenik tumorske nekroze- β



Slika 22. Klasificirana toplinska karta od 11 različitih citokina u plazmi uključujući svih 100 bolesnika sa stabilnim KOPB-om.

Koncentracije citokina su bile prije hijerarhijske analize klastera $\log_{10}(x + 1)$ transformirane

Metoda skaliranja za citokine: Z-ocjena, metoda klasteriranja: potpuna povezanost (krajnji susjed), metoda udaljenosti: euklidska;

Metoda skaliranja za bolesnike: Nema; Metoda grupiranja: Potpuna povezanost (najdalji susjed), Metoda udaljenosti: Euklidska.

Toplinska karta prikazuje pravokutnik za svaku koncentraciju citokina za svakog bolesnika, a svaka boja pravokutnika prikazuje koncentraciju citokina u usporedbi sa srednjom vrijednošću i korigirana je za SD.

Koncentracije citokina prikazane su horizontalno, a bolesnici vertikalno. Stablo se formira na vrhu slike koja pokazuje grupiranje različitih citokina - 2 klastera (C1 , C2), a lijevo se formira stablo koje prikazuje bolesnike koji formiraju klaster prema koncentraciji citokina. Postoji 5 većih skupina za vrijednosti citokina u bolesnika s KOPB-om obojanih različitim bojama i označenih oznakama (A , B , C , D i E) i 3 manja klastera (, ,).

4.1.4 Udio apoptoznih i nekroznih leukocita

Tablica 9. prikazuje relativni udio leukocita odnosno subpopulaciju granulocita, limfocita i monocita u procesu apoptoze i nekroze izmjerenih s CD45 antitijelom i Aneksin-V-FITC-om na protočnom citometru u skupinama bolesnika s KOPB-om bez odnosno na terapiji statinima. Relativni udio svih leukocita, te subpopulacija limfocita i monocita u procesu apoptoze pokazali su statistički značajno smanjenje u krvi bolesnika s KOPB-om koji su uzimali statine dulje od godine dana, za razliku od bolesnika koji nisu bili na terapiji statinima. Iako, relativni udio granulocita u procesu apoptoze nije pokazao značajnu razliku, u bolesnika koji su bili na terapiji statinima taj udio je bio snižen u odnosu na bolesnike bez terapije.

Slika 23. prikazuje rezultate mjerenja s protočnog citometra tj. relativni udio apoptoze i nekroze leukocita periferne krvi kao primjer za jednog bolesnika s KOPB-om.

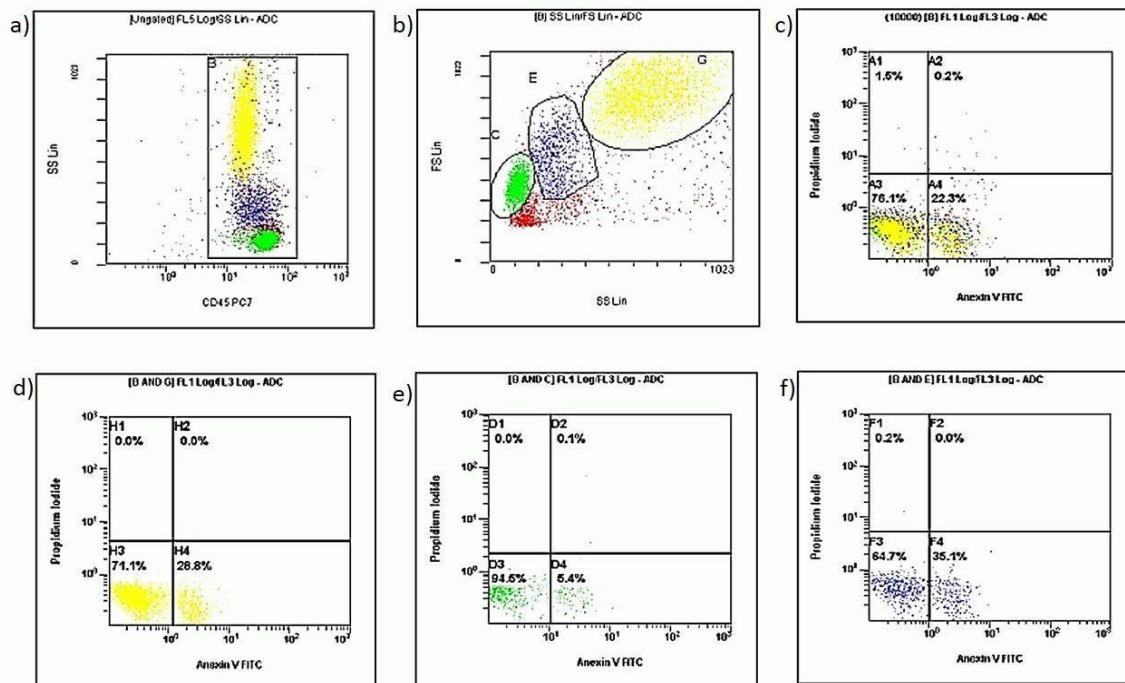
Prikaz apoptoznih i nekroznih leukocita izvedene TUNEL metodom prikazana je na slici za nekoliko bolesnika (N=3) ovisno o terapiji statinima (Slika 24.). TUNEL metoda je ovdje korištena isključivo kao kvalitativna tehnika, iako se pregledom fotomikrografija perifernih krvnih stanica bolesnika s KOPB-om koji nisu bili na terapiji statinima uočavalo više leukocita u procesu apoptoze u odnosu na ispitanike koji su bili na terapiji statinima.

Tablica 9. Prikaz relativnih udjela leukocita u apoptozi i nekrozi izmjerenih na protočnom citometru u krvi bolesnika s KOPB-om bez i na terapiji statinima

Parametri	KOPB bolesnici bez terapije statinima	KOPB bolesnici na terapiji statinima	P vrijednost
Broj bolesnika (N)	51	17	
Leukociti u apoptozi (%)	28,2 (22,2 -32,6)	21,4 (17,9 – 28,5)	0,032*
Granulociti u apoptozi (%)	28,4 (18,0 -36,1)	23,0 (16,4 – 29,9)	0,185
Limfociti u apoptozi (%)	12,5 (10,4 – 16,3)	8,5 (6,4 – 11,2)	0,009*
Monociti u apoptozi (%)	83,6 (77,6– 87,4)	74,2 (58,5 – 82,4)	0,004*
Leukociti u nekrozi (%)	0,89 (0,67 – 1,15)	0,63 (0,21 – 1,06)	0,076
Granulociti u nekrozi (%)	0,04 (0,02 – 0,08)	0,02 (0,00 – 0,04)	0,099
Limfociti u nekrozi (%)	0,08 (0,00 – 0,16)	0,07 (0,00 – 0,14)	0,782
Monociti u nekrozi (%)	0,18 (0,10 – 0,37)	0,11 (0,00 – 0,35)	0,243

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom, iako podaci slijede normalnu razdiobu (testirano Kolmogorov-Smirnov testom), zbog maloga broja uzoraka korištena je neparametrijska statistika; P vrijednost je izračunata sa Mann-Whitney testom

Statistički značajni rezultati imaju $P < 0,05$ i podebljani su te označeni s *



Slika 23. Reprezentativni točkasti prikaz (*engl. dot plot*) za mjerenje relativnog udjela apoptoze i nekroze leukocita na protočnom citometru (*Cytomics FC 500, Beckman Coulter*), prikazano je bojanje leukocita s antitijelom CD45, propidij-jodidom i annexin-V-FITC-om za jednog bolesnika s KOPB-om.

a) CD45-PC7 vs. SS scatter

b) SS vs. FS dot plot, C-limfociti, E-monociti, G-granulociti

c) Annexin-V-FITC vs. propidij jodid scatter, leukociti

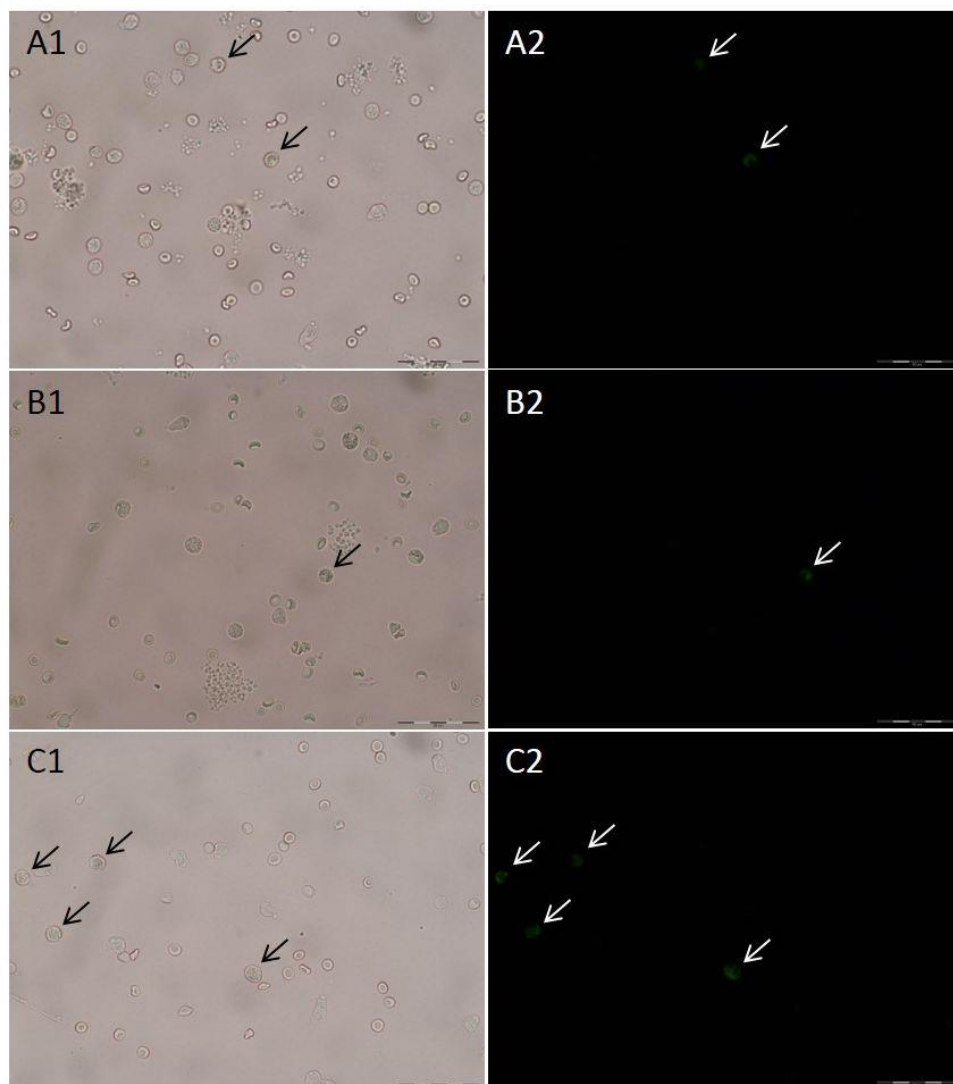
d) Annexin-V-FITC vs. propidij jodid scatter, granulociti

e) Annexin-V-FITC vs. propidij jodid scatter, limfociti

f) Annexin-V-FITC vs. propidij jodid scatter, monociti

a) na temelju bojanja s CD45-PC7 i *side scatter* (SS) karakteristika identificirana je populacija leukocita, sva daljnja analiza je provedena na stanicama iz gate-a B; b) identifikacija tipova stanica na temelju CD45 bojanja i FS i SS karakteristika. C gate sadrži limfocite, E gate sadrži monocite i G gate granulocite; c) desni niži kvadrant predstavlja sve leukocite u procesu apoptoze, desni viši

kvadrant predstavlja sve leukocite u procesu nekroze i u nekrozi; d) desni niži kvadrant predstavlja sve granulocite u procesu apoptoze, a desni viši kvadrant predstavlja sve granulocite u procesu nekroze i u nekrozi; e) desni niži kvadrant predstavlja sve limfocite u procesu apoptoze, a desni viši kvadrant predstavlja sve limfocite u procesu nekroze i u nekrozi; f) donji desni kvadrant predstavlja sve monocite u procesu apoptoze, a desni viši kvadrant predstavlja sve monocite u procesu nekroze i u nekrozi



Slika 24. Reprezentativne fotomikrografije s fluorescentnog mikroskopa (*Olympus BX50*, *Olympus*) perifernih krvnih stanica bolesnika s KOPB-om. Slike lijevo: A1, B1 i C1 su nativni prikazi, a slike desno A2, B2 i C2 su prikazi TUNEL reakcija za iste bolesnike. Leukociti su obojani s FITC–dUTP s TUNEL tehnikom (x400). TUNEL pozitivne jezgre obojane su zeleno i ukazuju na stanice u apoptozi. Preparati bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima prikazani su na slikama A1 i A2 te B1 i B2, a preparati bolesnika s KOPB-om bez terapije statinima na slikama C1 i C2.

4.2 Rezultati bolesnika s KOPB-om prema GOLD klasifikaciji

Bolesnici s KOPB-om su podijeljeni u četiri skupine ovisno o težini odnosno stupnju oboljenja prema revidiranoj kombiniranoj GOLD klasifikaciji iz 11/2016. Prikaz osnovnih karateristika bolesnika kao što su spol, dob, FEV₁, ITM, pušačke navike i komorbiditeti prikazane su u Tablici 10.

Koncentracije citokina nisu pokazale statistički značajnu razliku ovisno o podjeli bolesnika prema težini oboljenja odnosno GOLD stadiju, što je prikazano u Tablici 11.

Osnovni hematološki parametri koji su pokazali statistički značajnu razliku ovisno o klasifikaciji prema GOLD-u su prikazani u Tablici 12. U istoj tablici je kao parametar sistemske upale prikazana i koncentracija CRP-a koji nije pokazao značajnu razliku ovisno o GOLD stadiju bolesnika (Tablica 12.).

Statistički značajna razlika je prisutna u broju leukocita, neutrofilnih i eozinofilnih granulocita, limfocita i monocita u bolesnika s KOPB-om u najtežem stupnju po GOLD klasifikaciji GOLD D, pri čemu je apsolutni broj navedenih krvnih stanica povećan u odnosu na skupine GOLD A, B i C.

Tablica 10. Karakteristike bolesnika s KOPB-om klasificiranih po GOLD stadiju (A-D), prema revidiranoj GOLD klasifikaciji iz 2017. (7)

Karakteristike	GOLD A (N=28)	GOLD B (N=37)	GOLD C (N=19)	GOLD D (N=16)	P vrijednost
Dob bolesnika (godine)	73 (55-84)	66 (54-80)	67 (52-80)	64 (53-82)	0.124
Spol (muški/ženski)	22/6	27/10	12/7	10/6	0.175
FEV₁ (%)	68.1 ± 12.9*	54.6 ± 15.4*	41.8 ± 12.0*	39.1 ± 7.6*	<0.001*
Pušačke navike (nepušač/bivši / pušač)	2/19/7	1/22/14	0/13/6	0/11/5	0,708
Pušačke godine (pack/years)	35.5 ± 23.4	41.2 ± 15.5	41.0 ± 25.8	54.1 ± 38.5	0.121
ITM (kg/m²)	27.4± 3.9	28.9 ± 5.7	26.2 ± 3.7	28.8 ± 7.5	0.319
Hipertenzija (da/ne)	18/10	25/12	12/7	11/5	0,978
Dijabetes mellitus (da/ne)	5/23	3/34	2/17	2/14	0,686
Osteoporoza (da/ne)	5/23	1/36	8/11	4/12	0,003*

Rezultati su prikazani sa srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom; dob bolesnika je prikazana sa medijanom (minimum-maksimum); P vrijednost je izračunata s ANOVA testom, statistički značajni rezultati imaju $P < 0,05$ i označeni su s *, post-hoc test je bio Student-Newman-Keuls-ov test za parne usporedbe. FEV₁ % je bio različit u skupinama A vs. B, C i D; B vs. A, C, i D; skupina C je bila različita od skupine A i B, a skupina D je bila različita od skupina A i B.

Kategorički podaci su testirani s frekvencijskom tablicom i χ^2 -testom; FEV₁ (forsirani izdisajni volumen u 1 sekundi), ITM (indeks tjelesne mase)

Tablica 11. Prikaz koncentracija citokina po skupinama bolesnika s KOPB-om klasificiranih po GOLD stadiju (A-D), prema revidiranoj GOLD klasifikaciji iz 2017. (7)

Citokini	GOLD A (N=28)	GOLD B (N=37)	GOLD C (N=19)	GOLD D (N=16)	P vrijednost
IL-1β (ng/L)	21,5 (9,3-26,0)	21,2 (15,1-23,4)	20,6 (19,2-22,1)	19,8 (0,0-22,0)	0,320
IL-2 (ng/L)	22,1 (9,8-24,5)	21,3 (12,8-24,5)	22,9 (20,2-25,6)	21,0 (0,0-23,3)	0,416
IL-4 (ng/L)	16,0 (3,3-21,9)	17,3 (3,8-18,7)	16,8 (14,9-18,3)	15,8 (0,0-17,2)	0,484
IL-5 (ng/L)	13,1 (9,8-184,3)	12,7 (9,8-36,9)	12,1 (8,8-16,5)	12,4 (8,7-65,8)	0,797
IL-6 (ng/L)	3,0 (0,7-6,4)	5,6 (1,4-8,2)	1,4 (0,0-5,7)	1,5 (0,0-6,4)	0,108
IL-8 (ng/L)	33,7 (0,7-563,8)	9,3 (3,7-106,1)	37,8 (3,9-210,9)	97,6 (3,4-1285,2)	0,706
IL-10 (ng/L)	16,9 (0,0-21,2)	17,7 (0,0-22,2)	16,9 (14,5-19,6)	16,5 (0,0-17,5)	0,255
IL-12 p70 (ng/L)	5,0 (2,0-7,3)	4,8 (3,4-6,2)	5,0 (4,0-6,0)	3,5 (0,0-4,4)	0,061
TNF-α (ng/L)	14,5 (0,0-26,9)	16,1 (10,7-23,0)	14,5 (12,8-19,1)	13,6 (0,0-19,5)	0,433

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom, P vrijednost je izračunata s Kruskal-Wallis-ovim testom

IL- interleukin; IFN- γ - interferon- γ ; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; TNF- β - čimbenik tumorske nekroze- β

Tablica 12. Prikaz broja leukocita i subpopulacija leukocita, te koncentracije CRP-a u bolesnika s KOPB-om klasificiranih po GOLD stadiju (A-D), prema revidiranoj GOLD klasifikaciji iz 2017.

(7)

	GOLD A (N=21)	GOLD B (N=33)	GOLD C (N=19)	GOLD D (N=11)	P vrijednost
Leukociti (x10⁹/L)	7,0 (5,7-8,0)	8,2 (7,3-9,4)	7,4 (4,8-9,3)	9,4 (7,8-11,3)	0,004*
Neutrofilni granulociti (x10⁹/L)	4,2 (3,5-4,9)	4,9 (4,2-6,1)	4,9 (3,0-6,6)	6,5 (4,5-7,2)	0,036*
Limfociti (x10⁹/L)	1,5 (1,4-1,9)	2,0 (1,8-2,5)	1,6 (1,1-2,1)	1,7 (1,6-1,9)	0,014*
Monociti (x10⁹/L)	0,6 (0,5-0,6)	0,7(0,6-0,8)	0,5 (0,4-0,7)	0,8 (0,6-1,0)	0,006*
Eozinofilni granulociti (x10⁹/L)	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,3)	0,1 (0,1-0,2)	0,3 (0,1-0,3)	0,045*
CRP (mg/L)	2,10 (1,25-6,07)	3,47 (1,66-5,98)	2,96 (1,48-6,57)	2,86 (1,64-7,81)	0,680

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom, P vrijednost je izračunata s Kruskal-Wallis-ovim testom, statistički značajni rezultati imaju $P < 0,05$ i označeni su s * i podebljani

Broj leukocita, neutrofilnih i eozinofilnih granulocita, limfocita i monocita je bio statistički značajno različit u skupini D u odnosu na skupine A, B i C.

CRP- C-reaktivni protein

4.3 Rezultati koncentracije citokina prema pušačkim godinama, indeksu tjelesne mase, terapiji inhalacijskim kortikosteroidima i hipertenziji

U svrhu ispitivanja utjecaja pušačkih navika na koncentraciju citokina također je napravljena podjela bolesnika s KOPB-om prema tome jesu li bili aktivni pušači ili bivši pušači. Obzirom da je bilo samo 3 nepušača među bolesnicima s KOPB-om za njih nije rađena statistička obrada u ovom istraživanju. Obzirom na pušačke navike bolesnika nije bilo značajne razlike u koncentracijama citokina. Podaci su prikazani u Tablici 13.

Utjecaj ITM-a na koncentracije citokina je ispitana s podjelom bolesnika s KOPB-om obzirom na normalni ($ITM=20-25 \text{ kg/m}^2$) i povišeni ITM ($> 25 \text{ kg/m}^2$). Statistički značajno smanjenje koncentracije citokina IL-4 ($P=0,027$), IL-8 ($P=0,041$) i IL-10 ($P=0,023$) prisutno je u bolesnika s KOPB-om povećanog ITM –a u odnosu na bolesnike s normalnim ITM-om. Podaci su prikazani u Tablici 14.

Utjecaj ICS terapije koju uzimaju bolesnici s KOPB-om na koncentracije citokina u sistemske cirkulaciji prikazan je u Tablici 15. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama citokina ovisno o podjeli bolesnika s KOPB-om prema ICS terapiji.

Obzirom na učestalost hipertenzije u bolesnika s KOPB-om, napravljena je i podjela bolesnika s hipertenzijom koji su na antihipertenzivima, te bez hipertenzije koji ne primaju terapiju. Koncentracije citokina nisu pokazale statistički značajnu razliku u tim dvjema skupinama. Rezultati su vidljivi u Tablici 16.

Tablica 13. Koncentracija citokina u bolesnika s KOPB-om podijeljenih u skupine ovisno o pušačkim navikama

Parametri	Pušač	Bivši pušač	P vrijednost
Broj bolesnika (N)	32	65	
IL-1β (ng/L)	20,75 (19,02 – 23,66)	21,16 (0,00 – 22,81)	0,597
IL-2 (ng/L)	23,06 (19,91 – 42,46)	21,26 (0,00 – 23,48)	0,079
IL-4 (ng/L)	16,81 (14,09 – 20,06)	16,28 (0,00 – 18,41)	0,297
IL-5 (ng/L)	14,86 (11,37 – 64,05)	12,05 (9,34 – 52,44)	0,189
IL-6 (ng/L)	4,42 (1,39 – 7,22)	2,81 (0,00 – 7,41)	0,243
IL-8 (ng/L)	13,41 (6,52 – 232,54)	12,51 (2,16 – 392,81)	0,541
IL-10 (ng/L)	18,27 (7,18 – 23,03)	16,22 (0,00 – 19,63)	0,187
IL-12p70 (ng/L)	4,69 (3,65 – 6,48)	4,35 (2,25 – 5,65)	0,490
IFN-γ (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/
TNF-α (ng/L)	16,99 (11,15 – 21,27)	14,46 (0,00 – 19,54)	0,386
TNF-β (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom, jer ne slijede normalnu razdiobu (testirano Kolmogorov-Smirnov-im testom); P vrijednost je izračunata s Mann-Whitney testom za nezavisne uzorke zbog nenormalne razdiobe podataka

IL- interleukin; IFN- γ - interferon- γ ; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; TNF- β - čimbenik tumorske nekroze- β

Tablica 14. Koncentracija citokina u bolesnika s KOPB-om podijeljenih u skupine ovisno o indeksu tjelesne mase (ITM)

Parametri	Indeks tjelesne mase (kg/m ²)		P vrijednost
	20,0 – 25,0	> 25,0	
Broj bolesnika (N)	28	59	
IL-1β (ng/L)	21,16 (20,35 – 23,23)	20,62 (0,00 – 22,81)	0,129
IL-2 (ng/L)	22,92 (20,59 – 27,62)	20,45 (0,00 – 24,05)	0,053
IL-4 (ng/L)	17,33 (15,76 – 19,37)	15,24 (0,00 – 18,41)	0,027*
IL-5 (ng/L)	11,71 (9,84 – 17,96)	12,74 (9,34 – 104,21)	0,646
IL-6 (ng/L)	2,64 (0,18 – 7,22)	4,08 (0,44 – 7,63)	0,465
IL-8 (ng/L)	62,11 (6,58 – 506,49)	9,29 (1,51 – 161,45)	0,041*
IL-10 (ng/L)	18,76 (16,81 – 24,77)	16,22 (0,00 – 19,63)	0,023*
IL-12p70 (ng/L)	4,82 (4,02 – 6,02)	4,43 (0,00 – 5,93)	0,258
IFN-γ (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/
TNF-α (ng/L)	16,14 (12,79 – 20,84)	14,46 (0,00 – 19,54)	0,126
TNF-β (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom, jer ne slijede normalnu razdiobu (testirano Kolmogorov-Smirnov-im testom); P vrijednost je izračunata s Mann-Whitney testom za nezavisne uzorke zbog nenormalne razdiobe podataka

IL- interleukin; IFN- γ - interferon- γ ; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; TNF- β - čimbenik tumorske nekroze- β

Tablica 15. Koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om na terapiji inhalacijskim kortikosteroidima (ICS) i bez terapije ICS-om

Parametri	KOPB bolesnici bez terapije ICS-a	KOPB bolesnici s terapijom ICS-a	P vrijednost
Broj bolesnika (N)	83	15	
IL-1 β (ng/L)	21,16 (18,63 – 23,09)	19,02 (0,00 – 22,67)	0,183
IL-2 (ng/L)	22,36 (17,49 – 25,20)	20,72 (0,00 – 22,78)	0,142
IL-4 (ng/L)	16,28 (10,00 – 18,88)	15,76 (0,00 – 18,14)	0,225
IL-5 (ng/L)	12,05 (9,34 – 43,03)	17,77 (11,71 – 155,70)	0,125
IL-6 (ng/L)	3,53 (0,09 – 7,23)	2,81 (1,39 – 6,04)	0,756
IL-8 (ng/L)	13,71 (2,77 – 399,03)	9,29 (0,89 – 304,24)	0,601
IL-10 (ng/L)	17,17 (0,00 – 20,14)	17,65 (0,00 – 19,63)	0,618
IL-12p70 (ng/L)	4,77 (3,63 – 6,29)	4,10 (0,00 – 5,80)	0,140
IFN- γ (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/
TNF- α (ng/L)	16,14 (9,51 – 21,27)	14,46 (0,00 – 18,90)	0,221
TNF- β (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom jer slijede nenormalnu razdiobu (Kolmogorov-Smirnov test), P vrijednost je izračunata s Mann-Whitney-evim testom za neparne uzorke i za nenormalnu razdiobu podataka

IL- interleukin; IFN- γ - interferon- γ ; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; TNF- β - čimbenik tumorske nekroze- β

Tablica 16. Koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om s i bez hipertenzije

Parametri	KOPB bolesnici bez hipertenzije (nema terapije)	KOPB bolesnici s hipertenzijom (pije antihipertenziv)	P vrijednost
Broj bolesnika (N)	34	66	
IL-1β (ng/L)	21,16 (19,55 – 22,25)	21,03 (0,00 – 23,37)	0,659
IL-2 (ng/L)	22,92 (19,65 – 25,49)	21,26 (0,00 – 24,05)	0,115
IL-4 (ng/L)	16,3 (14,22 – 17,87)	16,8 (0,00 – 18,95)	0,876
IL-5 (ng/L)	11,36 (9,34 – 17,03)	13,44 (10,01 – 154,4)	0,133
IL-6 (ng/L)	1,39 (0,00 – 6,09)	4,17 (0,69 – 7,76)	0,098
IL-8 (ng/L)	10,99 (4,88 – 324,20)	17,52 (2,31 – 361,14)	0,779
IL-10 (ng/L)	17,17 (14,82 – 20,91)	17,17 (0,00 – 20,14)	0,436
IL-12p70 (ng/L)	4,95 (3,94 – 5,83)	4,27 (0,00 - 6,11)	0,216
IFN-γ (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/
TNF-α (ng/L)	16,14 (12,79 – 20,41)	14,88 (0,00 – 19,54)	0,369
TNF-β (ng/L)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	/

Rezultati su prikazani s medijanom i interkvartilnim rasponom jer slijede nenormalnu razdiobu (Kolmogorov-Smirnov test), P vrijednost je izračunata s Mann-Whitney testom za neparne uzorke za nenormalnu razdiobu podataka

IL- interleukin; IFN- γ - interferon- γ ; TNF- α - čimbenik tumorske nekroze- α ; TNF- β - čimbenik tumorske nekroze- β

5. RASPRAVA

Prema rezultatima ovoga rada u bolesnika s KOPB-om koji su uzimali statine dulje od godine dana došlo je do smanjenja koncentracije sljedećih citokina: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α . Vrijednosti citokina IL-5 i IL-6 nisu pokazale statistički značajnu promjenu, iako su pokazale povećanje koncentracije u bolesnika s KOPB-om bez terapije statinima (145). Pokazana je međusobna korelacija koncentracije citokina u svih bolesnika s KOPB-om bez obzira na terapiju statinima, što govori u prilog opravdanosti mjerenja koncentracije više citokina odjednom, u istom uzorku u bolesnika kao i o složenom odnosu citokinske mreže.

U ovom radu skupine bolesnika nisu se razlikovale u dobi, stadiju bolesti i prisutnim komorbiditetima kao što su kardiovaskularne bolesti i hipertenzija. Međutim, postoji očekivana statistički značajna razlika u koncentraciji lipida zbog terapije statinima. Statini pokazuju učinak, što je i očekivano, na smanjenje koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola u bolesnika s KOPB-om. Međutim, koncentracija HDL-kolesterola značajno je smanjena u bolesnika na statinima, u odnosu na one bez statina (145).

Smanjenje koncentracije citokina u bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima doprinosi prepoznavanju pleiotropnih učinaka statina. Statini pokazuju pleiotropne učinke, kao što su utjecaj na adheziju i agregaciju trombocita, smanjenje broja upalnih stanica, koncentraciju citokina i mnoge druge (4,5,19,146). Prema našem saznanju, ovo je prva studija koja pokazuje smanjenje koncentracije ovih citokina u sistemskoj cirkulaciji bolesnika s KOPB-om koji su na terapiji statinima. Brojne studije su procijenile korist statina u bolesnika s KOPB-om i njihovu ulogu u nižoj stopi egzacerbacija i mortaliteta (9). Iwata i sur. pokazali su smanjenje koncentracije IL-6 i IL-8 inducirano statinima u humanim bronhijalnim epitelnim stanicama (147). Lyngdoh i sur. nisu pronašli povezanost između upotrebe statina i koncentracija IL-1 β , TNF-a i IL-6 u zdravih bijelaca (106). Musial i sur. pokazali su smanjenje koncentracije CRP-a, IL-6 i TNF-a kod muškaraca s hiperkolesterolemijom nakon 3 mjeseca terapije simvastatinom (148). Studija provedena u Brazilu pokazala je utjecaj statina na koncentracije citokina i kemokina IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- β i MCP u serumu (149). Pereira i sur. su u tom istraživanju na ispitanicima s hiperkolesterolemijom pokazali da su koncentracije aterogenih citokina IL-1 β i kemokina IL-8, te MCP-a pod utjecajem statina kod muškaraca snižene, IL-6 nije pokazao statistički značajnu

promjenu, dok su IL-8 i TNF- α pokazali povećanje, a IL-10 smanjenje koncentracije, ali samo kod žena s anamnezom akutnog infarkta miokarda (AIM) (149). Ova studija je pokazala da ovisno i o spolu te o prijašnjoj anamnezi postoje razlike u utjecaju statina na koncentracije citokina kod određenih populacija bolesnika (149). Nadalje, prospektivno istraživanje Kaczmarek i sur. pokazalo je da simvastatin nakon terapije tijekom 3 mjeseca u bolesnika s KOPB-om ne utječe na koncentraciju fibrinogena, CRP-a, TNF- α , IL-6 i MMP-9 (150). Međutim, pojedine druge studije ne ukazuju na potencijalnu korist od uzimanja statina, osim u bolesnika s KOPB-om s poznatim kardiovaskularnim komorbiditetima (5,151).

IL-1 β je središnji medijator koji sudjeluje u urođenoj imunosti i upali (34). Jedan je od ključnih citokina koji pokreće neutrofilnu upalu u dišnim putovima kod KOPB-a (35). Koncentracija IL-1 β je povećana u serumu bolesnika s KOPB-om u akutnoj egzacerbaciji u odnosu na stabilnu fazu KOPB-a, ali i u stabilnoj fazi KOPB-a u odnosu na zdrave ispitanike (35).

IL-2 je jedan od glavnih T-staničnih faktora rasta, te je nađeno da je oslobađanje IL-2 povećano kod Th1 stanica u bolesnika s KOPB-om (152).

IL-4 je Th2 citokin koji uz IL-5 i IL-13 ima ulogu u eozinofilnom i alergijskom upalnom procesu, te ima ulogu u astmi (41,153). Paats i sur. su pronašli povećani udio IL-4 u CD8+ stanicama u bolesnika s KOPB-om, ali razlike nisu bile značajne u odnosu na zdrave ispitanike (110). Dokazano je da simvastatin inhibira ekspresiju CCR3 induciranu s IL-5 i kemotaksiju eozinofila koja je posredovana putem mevalonata, tako da simvastatin reducira infiltraciju eozinofila kod alergijskog rinitisa (154).

IL-6 je ispitan u mnogim istraživanjima i smatra se jednim od stabilnijih citokina u perifernoj cirkulaciji te su za njega na tržištu već dostupni komercijalni kitovi koji omogućuju rutinsko određivanje njegove koncentracije. Ipak, u ovom radu nije dobivena značajna promjena u koncentraciji IL-6, usprkos očekivanjima. IL-6 je citokin koji potiče oslobađanje CRP-a iz jetre, a CRP kod naših bolesnika također ne pokazuje statistički značajnu promjenu. Možda statini snižavaju uz CRP i IL-6 koji stoga ne pokazuje promjenu u odnosu na ispitanike koji nisu na terapiji statinima. Inače, IL-6 i IL-8 su povezani s učestalošću egzacerbacija kod KOPB-a i mogu biti značajno povećani, u usporedbi sa stabilnom fazom KOPB-a, što govori u prilog upali u dišnim putovima u kojoj sudjeluju navedeni citokini (155). Ipak, meta-analiza objavljena 2017. godine, pokazala je da upalni citokini IL-6 i IL-8 ne mogu služiti kao sistemski pokazatelji upale kod

KOPB-a, za razliku od TNF- α i CRP-a (156). Bucchioni i sur. su opisali povećanje koncentracije IL-6 u kondenzatu izdahnutog zraka u KOPB bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike (115).

IL-8 je multifunkcionalni kemokin, koji sudjeluje u infiltraciji neutrofila i kemotaksiji prilikom upale (155). El-Shimy i sur. su pokazali da je koncentracija IL-8 i pro-upalnih citokina IL-6 i TNF- α u serumu i BAL-u veća u bolesnika s KOPB-om s težim stupnjem u odnosu na blagi do umjereni stupanj prema GOLD-u i u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika (155). Korelacija između koncentracije IL-6, IL-8 i TNF- α te FEV₁ je bila negativna u toj studiji (155). Rezaie-Majd i sur. su pokazali da je terapija simvastatinom kod ispitanika s hiperkolesterolemijom dovela do smanjenja koncentracije upalnih citokina IL-6, IL-8 i MCP-1 u serumu, ali i u *in vitro* pokusima na humanim umbilikalnim vaskularnim endotelnim stanicama i periferenim krvnim mononuklearnim stanicama tretiranim sa statinima (157). Autori te studije smatraju da inhibicija citokina inducirana statinima ima važnu ulogu u farmakološkim i kliničkim učincima statina u kardiovaskularnim bolestima (157).

IL-10 je protuupalni citokin koji djeluje na snižavanje upalnih citokina (158). IL-10 je u ovom istraživanju u bolesnika s KOPB-om na statinima pokazao statistički značajno niže koncentracije u odnosu na bolesnike koji nisu uzimali statine. IL-10 porastao je u supernatantu sputuma bolesnika sa stabilnim KOPB-om (GOLD B) u usporedbi s bazalnim vrijednostima nakon terapije simvastatinom, dok nije bilo promjene kod ispitanika koji su dobivali placebo (159). Maneechotesuwan i sur. su pokazali da simvastatin inhibira IL-17, IL-22, IL-8 i IL-6 i uzrokuje povećanje IL-10 u sputumu bolesnika sa stabilnim KOPB-om GOLD B (159). U toj studiji nije došlo do promjene koncentracije CRP-a bez obzira na terapiju simvastatinom (159).

Cimato i sur. su u zdravih ispitanika bez poznate koronarne bolesti ispitivali utjecaj statina na Th1 citokine te nisu našli promjene u koncentracijama IL-12p40, IL-18 i IL-27 (160). Autori smatraju da statini ipak imaju utjecaj na modulaciju citokina i da kod zdravih ispitanika nije prisutna upalna reakcija pa izostaje utjecaj statina na koncentraciju citokina (160). U toj studiji su prikazani i preliminarni dokazi o interakciji serumskih lipida i Th1 citokina u ispitanika bez ateroskleroze (160). Prikazana je korelacija IL-18 s kolesterolom i obrnuta korelacija između IL-12p40 i HDL-kolesterola, apolipoproteina A1 i lipoproteina (a) (160).

TNF- α je marker sistemske upale koji je povezan sa povećanjem koncentracije ovisno o težini stadija KOPB-a te je prisutan i porast kod disfunkcije mišića prilikom umjerene fizičke vježbe u usporedbi sa zdravim kontrolnim ispitanicima (161). Koncentracija TNF- α u krvi izrazito

varira i čini se da njegovo mjerenje nije izrazito reproducibilno (161). Marević i sur. su pokazali da TNF- α u serumu nije povećan u bolesnika sa stabilnim KOPB-om u odnosu na zdrave pušače i nepušače (162).

Izmjerene vrijednosti IFN- γ i TNF- β su uglavnom bile ispod praga detekcije metode koja se koristila u ovom radu.

Koncentracije CRP-a se ne razlikuju u bolesnika s KOPB-om s i bez terapije statinima. CRP kao faktor rizika za kardiovaskularne bolesti se koristi i pri odluci kod terapije statinima. Radovi pokazuju smanjenje koncentracije CRP-a pod utjecajem statina. Međutim, u ovom radu nije nađena značajna razlika u koncentraciji CRP-a s i bez terapije statinima. Gan i sur. su pokazali da je koncentracija CRP-a veća kod pušača i u bolesnika s KOPB-om sa smanjenom plućnom funkcijom (163). Ipak, klinička korist od koncentracije CRP-a kao prediktora kod KOPB je upitna (161). Na koncentraciju CRP-a utječu i drugi čimbenici kao kardiovaskularne bolesti, ali i fizička aktivnost, dijabetes mellitus, bolesti bubrega, hipertenzija kao i terapija lijekovima kao što su statini, što ne doprinosi značaju određivanja CRP-a kod tih bolesnika kao prediktora razvoja bolesti ili egzacerbacija, osim, naravno, u stanju bakterijskih ili težih infektivnih bolesti (156,163). Marević i sur. su pokazali da bolesnici sa stabilnim KOPB-om imaju povećane koncentracije CRP-a u odnosu na zdrave pušače i nepušače, te da bi CRP ipak mogao služiti kao prediktor progresije KOPB-a (162).

Koncentracija mokraćne kiseline je pokazala statistički značajno povećanje u bolesnika s KOPB-om na statinima, a albumin smanjenje koncentracije. Mokraćna kiselina u serumu je produkt katabolizma purina i važan je izvanstanični antioksidans prisutan u respiracijskom sustavu traktu (164). Mokraćna kiselina se danas spominje kao jedan od parametara koji korelira s težinom KOPB-a (164). Rezultati ovog istraživanja pokazuju u skupini bolesnika s KOPB-om na statinima povećane koncentracije mokraćne kiseline u odnosu na bolesnike bez terapije statinima. Prema MDRD jednadžbi kojom je procijenjena glomerularna filtracija, dio naših ispitanika s KOPB-om ima smanjeni eGFR $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ te do porasta mokraćne kiseline možda dolazi zbog oštećenja bubrežne funkcije. Nadalje bolesnici na statinima također imaju statistički značajno povećanu koncentraciju glukoze, usprkos tome što u toj skupini nema više bolesnika s dijabetesom mellitusom tipa II u odnosu na skupinu KOPB bez terapije statinima. Kao jedna od nuspojava terapije statinima navodi se i hiperglikemija što bi objasnilo povećane koncentracije glukoze u skupini bolesnika s KOPB-om na statinima (18).

U ovom istraživanju, terapija sa statinima pokazala je utjecaj na koncentraciju citokina u bolesnika s KOPB-om, a to je vjerojatno zbog pleiotropnog učinka. Međutim, studija je bila mala, randomizirana, a ne prospektivna studija. Bolesnici su primali različite statine duže od godinu dana i imali su povijest hiperkolesterolemije i kardiovaskularnog rizika. Da li je ovaj učinak prisutan samo u bolesnika s KOPB-om s kardiovaskularnim bolestima ili kod svih bolesnika na statinima, tek treba detaljnije ispitati. Ipak, studije provedene na bolesnicima s kardiovaskularnim oboljenjima i hiperkolesterolemijom govore u prilog djelovanju statina i na koncentracije citokina (149).

Nedavno je više skupina istraživača istaknulo mogućnost korištenja hijerarhijske klasterke analize kako bi se otkrili određeni obrasci citokina u populaciji bolesnika (142–144). Hijerarhijska klasterka analiza u ovom istraživanju pokazala je nekoliko klastera u bolesnika s KOPB-om u skladu s vrijednostima citokina. Citokinski uzorci bili su u velikoj skupini pacijenata slični s umjerenim povećanjem vrijednosti citokina (klaster A, B i C). Bolesnici s KOPB-om koji su uzimali statine pokazali su različit obrazac/uzorak citokina s nižim vrijednostima citokina (klaster D). Citokini su formirali klaster (C1) koji pridonosi činjenici da postoji prisutan Th1 i Th2 citokinski obrazac kod stabilnih bolesnika s KOPB-om i da kompleksnu citokinsku mrežu treba istražiti s mnogostrukim mjerenjem više citokina u istom uzorku. Temeljem koncentracije IL-5 i IL-6 nisu oblikovan klaster. IFN- γ i TNF- β formirali su klaster (C2), jer iako su vrijednosti uglavnom bile ispod granice detekcije testa, logaritamskom transformacijom je omogućena analiza izmjerenih vrijednosti koje su tvorile klaster.

U ovom istraživanju u bolesnika s KOPB-om koji su bili na terapiji statinima došlo je do smanjenja relativnih udjela monocita i limfocita u apoptozi u odnosu na bolesnike koji nisu na statinima. Naime, bolesnici s KOPB-om u ovom istraživanju bez terapije statinima imaju koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola iznad preporučenih vrijednosti. Preporučene vrijednosti za kolesterol su $< 5,0$ mmol/L, a za LDL-kolesterol $< 3,0$ mmol/L prema Hrvatskoj komori medicinskih biokemičara (HKMB) (165).

Prema nekim znanstvenicima, poput Tabasa, kolesterol može doprinjeti procesu apoptoze stanica (166). Možda povišena koncentracija kolesterola i LDL-kolesterola pridonosi apoptozi leukocita periferne krvi u bolesnika s KOPB-om koji nisu uzimali statine. Povišene koncentracije kolesterola mogu potaknuti proces apoptoze, jer kolesterol ulazi u stanice, kao kod makrofaga u aterosklerotskim plakovima (166). Naime, endogena biosinteza kolesterola, u većini stanica,

kontrolirana je višestrukim mehanizmima homeostaze, te se suvišni kolesterol ne akumulira (166). Većina stanica posjeduje mehanizme za internalizaciju egzogenog kolesterola u obliku lipoproteina plazme, kao npr. stanice koje sintetiziraju steroide, hepatociti te makrofagi i glatke mišićne stanice u aterosklerotskim lezijama (166). Unos lipoproteina u stijenke arterija od strane makrofaga i glatkih mišićnih stanica pomaže endotelu uklanjanjem potencijalno štetnih lipoproteina. Ipak, ovaj stanični proces unosa lipoproteina naposljetku može doprinijeti progresiji i komplikaciji aterosklerotskih vaskularnih bolesti (166). Stanice, kao odgovor na nakupljanje kolesterola, mogu smanjiti endogenu biosintezu kolesterola i ekspresiju receptora za LDL (166). Nadalje, te stanice su razvile i druge mehanizme za spriječavanje akumulacije suvišnog neesterificiranog tj. slobodnog kolesterola, što govori u prilog mogućem toksičnom učinku slobodnog kolesterola (166). Mogući potencijalni mehanizmi za citotoksičnost slobodnog kolesterola su gubitak fluidnosti membrane, disrupcija membranskih domena, indukcija procesa apoptoze, unutarstanična kristalizacija kolesterola i stvaranje toksičnih oksisterola te moguća promjena ekspresije gena (166). Posljedice navedenih mehanizama mogu biti disfunkcija proteina membrane, prekid u signalizaciji, disrupcija organela i smrt stanice posredovana kaspazama (166). Zbog svega navedenog, slobodni kolesterol vjerojatno doprinosi većem relativnom udjelu leukocita odnosno subpopulacije monocita i limfocita u procesu apoptoze u bolesnika s KOPB-om bez terapije statinima u odnosu na bolesnike koji su na terapiji statinima. Također, ovo govori u prilog da je smanjenje relativnog udjela leukocita u procesu apoptoze u bolesnika s KOPB-om koji su koristili statine neizravna posljedica učinka statina djelovanjem na koncentraciju kolesterola. Međutim, nismo dokazali korelaciju između relativnih udjela stanica u apoptozu i kolesterola i LDL-kolesterola u skupini bolesnika koji su koristili statine.

Ghavami i sur. su pokazali da simvastatin aktivira nove putove apoptoze u primarnim humanim plućnim mezenhimalnim stanicama, tako da dolazi do aktivacije p53 i oslobađanja proteina inhibitora apoptoze (*engl. inhibitor of apoptosis proteins*, IAP), Smac i Omi, te dolazi do aktivacije kaspaza-3, -7 i -9 u glatkim mišićnim stanicama dišnih putova i fibroblastima (167). Chello i sur. pronašli su povećanu razinu apoptoze neutrofila nakon koronarne operacije u bolesnika prethodno liječenih simvastatinom (168). Mandal i sur. otkrili su da bolesnici s bronhiektazijom na terapiji atorvastatinom imaju povećani broj apoptoznih neutrofila, smanjenje održivih neutrofila i smanjenje ukupnog broja neutrofila iz sputuma u usporedbi s bolesnicima koji ne koriste atorvastatin (169). Iako su ove studije pokazale da statini povećavaju proces apoptoze u

različitim stanicama, rezultati su uglavnom dobiveni *in vitro* na kulturama stanica, dok su u ovoj studiji mjerenja apoptoze i nekroze leukocita učinjena odmah u svježim uzorcima. Međutim, ova studija podupire činjenicu da statini pokazuju i pleiotropne učinke, pri čemu se mehanizam djelovanja statina na apoptozu leukocita periferne krvi, ostvaruje neizravno, smanjenjem koncentracije kolesterola ili izravnim djelovanjem što je potrebno još istražiti.

Poremećaji u procesu apoptoze i uklanjanju infiltriranih imunskih stanica u plućima vjerojatno imaju važnu ulogu u patogenezi KOPB-a (131). Kod KOPB-a, neutrofili su ključne upalne stanice kao i potencijalni izvor supstanci koje dalje oštećuju tkivo (131). Upalna reakcija u tkivu, s prisutnom hipoksijom i upalnim medijatorima, predstavlja mikrookoliš koji omogućava odgodu apoptoze neutrofila i time se produžava upalno djelovanje neutrofila (131). Hodge i sur. su pokazali da alveolarni makrofagi bolesnika s KOPB-om imaju smanjenu sposobnost fagocitoze apoptoznih epitelnih stanica dišnih putova (170). Morimoto i sur. su pokazali da lovastatin pojačava eferocitozu *in vitro* i *in vivo* u ispitanika s KOPB-om (135). Moguće je da statini u ovoj studiji u bolesnika s KOPB-om povećavaju proces fagocitoze apoptoznih stanica i time smanjuju relativni udio leukocita u apoptozi u toj skupini. Stanice u apoptozi koje nisu "očišćene" tj. uklonjene mogu ulaziti u proces sekundarne nekroze i time doprinijeti upali pluća, ali je nejasno da li takve apoptozne stanice predstavljaju povećani udio stanica u procesu apoptoze ili je prisutan nedostatak u klirensu tih apoptoznih stanica (171).

Statini su u širokoj uporabi u liječenju kardiovaskularnih bolesti. Pojedine studije su pokazale da kod karcinoma, statini povećavaju apoptozu tumorskih stanica, dok se u nekanceroznim stanicama pojavljuju suprotni učinci (172). Također, može doći do promjene u apoptozi ili oštećenog klirensa apoptoznih leukocita periferne krvi u bolesnika sa stabilnim KOPB-om bez obzira na terapiju statinima. Hodge i sur. pokazali su povećanje apoptoze stimuliranih T-limfocita i promjenu u regulaciji putova apoptoze u perifernoj krvi ispitanika s KOPB-om (130). Pletz i sur. otkrili su da bolesnici s KOPB-om u egzacerbaciji pokazuju smanjenu apoptozu neutrofila periferne krvi, ali ne i bolesnici sa stabilnim KOPB-om (132). Povećani broj stanica u apoptozi uočen je u sputumu i plućnom tkivu u respiracijskih bolesti kao što su KOPB, astma i cistična fibroza (129). Lim i suradnici pronašli su porast apoptoze T-limfocita, CD4⁺ i CD8⁺ u perifernoj krvi bolesnika s KOPB-om tijekom egzacerbacija u usporedbi sa stabilnim bolesnicima s KOPB-om i zdravim kontrolnim ispitanicima (134). Zhang i sur. pokazali su da je udio apoptoze kultiviranih nestimuliranih neutrofila smanjen u bolesnika s KOPB-om i da je u usporedbi sa

zdravom kontrolom ekspresija mRNA bila pojačana za anti-apoptozne gene i smanjena za apoptozne gene (173).

U ovom radu, postoji nekoliko ograničenja u vezi ispitivanja apoptoze i nekroze leukocita periferne krvi u bolesnika s KOPB-om. Bolesnici s KOPB-om su primali različite statine kao što su simvastatin, atorvastatin i rosuvastatin u različitim dozama. Također, nije bilo ispitanika s visokim koncentracijama kolesterola bez i na terapiji statinima, a bez KOPB-a, kako bi ustanovili učinak povećanih koncentracija kolesterola na apoptozu leukocita periferne krvi. Međutim, *ex vivo* koncept ove studije, bez *in vitro* uzgoja i stimulacije stanica, predstavlja mogućnost za daljnja ispitivanja povezanosti između terapije statinima i apoptoze, kao i utjecaja kolesterola na proces apoptoze, kod bolesnika s KOPB-om i nema mnogo takvih studija.

Citokini ne pokazuju statistički značajne promjene kada se bolesnici s KOPB-om klasificiraju po stupnju GOLD-a (A, B, C, D). Ova studija je pokazala da Th1 i Th2 citokini nisu bili dobri biomarkeri za kliničku diferencijaciju bolesti u naših bolesnika s KOPB-om. Rezultati studija koje su ispitivale citokine u sistemskoj cirkulaciji kao biomarkere za procjenu težine KOPB-a su vrlo raznolike. Selvarajah i sur. pokazali su korelaciju koncentracije citokina u serumu s težinom KOPB-a prema GOLD podjeli (174). Ovi znanstvenici su koristili proteinsku mikročip tehnologiju (*engl. microarray*) za mjerenje koncentracije 14 citokina: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- α , TGF- β , IFN- γ , eotaksin-1, eotaksin-2, VEGF, MCP-1 i IP-10. Njihov je zaključak da istovremeno mjerenje panela citokina, a ne samo pojedinih citokina u serumu, ukazuje na težinu KOPB-a, kao i da su citokini pokazatelji sistemske upale, ali da isto tako doprinose i razvoju same sistemske upale u KOPB-u (174). Pinto-Plata i sur. pokazali su povećanje koncentracija IL-6 i TNF-a, ali ne i IL-8, u serumu bolesnika s KOPB-om kada su podijeljeni prema GOLD stadiju (I-IV) (51). Ovi autori smatraju da su IL-6, IL-8, TNF- α , MMP-9 i VEGF dobri biomarkeri za opstrukciju dišnih putova te funkcionalni kapacitet i zdravstveni status. Oni smatraju da promjene obrazaca biomarkera za upalnu reakciju koreliraju s kliničkim ishodom bolesti. Predložili su stoga tzv. toplinsku kartu (*engl. heatmap*) za interakciju između obrazaca izmjerenih biomakera i ishoda bolesti (*engl. ObServed Clinical Association Results*, OSCAR plot) (51). Karadag i sur. pokazali su da je TNF-a u serumu bio povećan u bolesnika s KOPB-om u težem stadiju prema GOLD-u (I-IV), te bi mogao biti indikator stadija odnosno težine KOPB-a (175). Kolsum i sur. otkrili su da su IL-6, TNF-a i CRP u perifernoj cirkulaciji bolesnika s KOPB-om umjereno ponovljivi tijekom jedne godine, te bi se mogli koristiti kao sistemski upalni biomarkeri

(116). ECLIPSE studija pokazala je slabu ponovljivost nekoliko citokina, među njima i citokina koji su određeni u ovom radu (176). Bradford i sur. su pokazali da su eotaksin, ali i IL-6, IL-2, IL-8 i IL-10 povišeni kod bolesnika s KOPB-om te povezani s opstrukcijom u dišnim putovima dok TNF- α i IFN- γ nisu (177). Također, ističu važnost mjerenja više citokina odjednom, te potrebu razvoja panela za mjerenje biomarkera u opservacijskim i intervencijskim studijama KOPB-a (177).

Rezultati ovoga rada pokazuju niz značajnih međusobnih korelacija između koncentracija Th1 i Th2 citokina u plazmi bolesnika s KOPB-om, što upućuje na zajedničke putove u regulaciji njihove ekspresije. Rezultati naglašavaju potrebu za mjerenjem panela citokina u KOPB-u kao biomarkera, a ne samo nekih citokina pojedinačno. Razlozi koji mogu objasniti dobivene rezultate su različiti. Rezultati također upućuju da bi klasifikacija bolesnika s KOPB-om prema fenotipu KOPB-a ili longitudinalno praćenje pojedinih bolesnika mogao biti prikladniji način za istraživanje biomarkera za napredovanje bolesti. Han i sur. predlažu podjelu bolesnika s KOPB-om po fenotipu u svrhu bolje prognoze bolesti, terapijskih podskupina, ali isto tako i u istraživačke svrhe (178).

U ovom istraživanju podjela bolesnika na fenotipove KOPB-a bi bila prikladnija za ispitivanje promjene koncentracije citokina, ali smo, nažalost, imali nedovoljno podataka za takvu podjelu bolesnika. Naime, predloženi fenotip KOPB-a sa sistemskom upalom ima povišene koncentracije sistemskih upalnih markera kao što su CRP, IL-6, IL-8, TNF- α i broj leukocita i čini se da povećane koncentracije tih parametara nisu prisutne kod svih bolesnika s KOPB-om (178). Nadalje, metode za mjerenje koncentracije citokina su uglavnom istraživačke i kitovi još nisu standardizirani, a poluživot citokina u sistemskoj cirkulaciji je različit. Je li usporedba koncentracije citokina iz različitih studija koje su koristile potpuno drugačije metode za mjerenje citokina prikladna pitanje je dobre laboratorijske prakse. Na sva ta pitanja i dalje treba odgovoriti. Bolesnici koji su uzimali sistemske kortikosteroide i protuupalne lijekove bili su isključeni iz ove studije. Međutim, utjecaj različitih terapija, kao što su statini, na koncentracije citokina, kao što je prikazano ovdje, može biti još jedan razlog za odsutnost promjene vrijednosti citokina u bolesnika s KOPB-om zbog stupnja težine oboljenja.

Pokazatelj upalnog stanja, broj leukocita, je bio u našem istraživanju povećan u bolesnika s KOPB-om u GOLD stupnju D. Rezultati pokazuju da u bolesnika s KOPB-om broj leukocita može poslužiti kao pokazatelj težine oboljenja. Koo i sur. su također pokazali potencijal broja leukocita kao biomarkera za težinu KOPB-a, te su povezali broj leukocita s trenutnim pušačkim

statusom, kvalitetom života i smatraju ih rizičnim čimbenikom za slabiju funkciju pluća (179). Ipak, smatraju da do povećanja broja leukocita u bolesnika s KOPB-om dolazi zbog pušenja, te bi kod nepušača ili bivših pušača s KOPB-om broj leukocita bio bolji biomarker za težinu oboljenja nego kod trenutnih pušača (179). Povećani broj leukocita pokazao je slabu povezanost s prisutnom sistemskom upalom, učestalim egzacerbacijama i mortalitetom u bolesnika s KOPB-om u ECLIPSE studiji (180). Ipak, zaključci ECLIPSE studije su da povećani broj leukocita može poslužiti kao relevantni biomarker u bolesnika s KOPB-om (180).

CRP, protein akutne faze, nije pokazao značajnu promjenu u naših bolesnika s KOPB-om s obzirom na stadije KOPB-a prema GOLD klasifikaciji. Ferrari i sur. su pratili bolesnike s KOPB-om tijekom 3 godine te nisu pronašli promjene u koncentraciji CRP-a, međutim, izmjerili su povećanje koncentracije IL-6 za koji smatraju da bi mogao poslužiti kao biomarker za procjenu progresije KOPB-a (117). U ranije objavljenom radu, pokazali smo da su u bolesnika sa stabilnim KOPB-om značajno povećane koncentracije CRP-a u usporedbi sa zdravim pušačima i nepušačima (162).

Pušačke navike bolesnika, kao što su bivši pušači i sadašnji pušači s KOPB-om nisu rezultirali značajnim razlikama u koncentraciji citokina. Nakamura i sur. pokazali su povećanje koncentracije IL-5, IL-7 i IL-13 u plazmi, smatraju da bi ovi biomarkeri mogli razlikovati osobe osjetljive na pušenje od neosjetljivih za potencijalni razvoj KOPB-a (181).

Istražen je utjecaj ITM-a na koncentraciju citokina te je prisutna statistički značajno niža koncentracija citokina IL-4, IL-8 i IL-10 u bolesnika s KOPB-om s ITM-om > 25 u odnosu na ispitanike s normalnim ITM-om od 20-25. Stapleton i sur. su mjerili koncentracije IL-6 i IL-8 kod ispitanika s akutnom ozljedom pluća i našli su obrnuto proporcionalnu povezanost izmjerenih citokina s ITM-om. Koncentracije citokina i ukupan broj leukocita bio je smanjen u ispitanika s povećanim ITM-om u odnosu na osobe s normalnim ITM-om, što ukazuje na potencijalnu ulogu debljine u urođenoj imunosti (182). U istraživanju od Moy i sur. ispitivan je odnos fizičke aktivnosti i upalnih markera u bolesnika s KOPB-om. Autori su pokazali da fizički aktivni ispitanici imaju smanjene koncentracije CRP-a i IL-6 što bi moglo doprinjeti i smanjenju sistemske upale koja je prisutna u bolesnika s KOPB-om (183). Karadag i sur. su pokazali da su koncentracije CRP i TNF- α povećane u bolesnika s KOPB-om s niskim ITM-om u odnosu na bolesnike s KOPB-om s normalnim do visokim ITM-om i da bi se ti parametri mogli potencijalno koristiti za procjenu malnutricije (175).

Kod malog broja bolesnika na terapiji ICS-a također nije došlo do statistički značajne razlike u koncentraciji citokina u sistemske cirkulaciji u odnosu na ispitanike koji nisu koristili ICS. Vjerojatno je to stoga što su sistemski učinci ICS-a manji, te bi za praćenje njihova utjecaja na citokine bilo učinkovitije mjeriti koncentraciju citokina lokalno, odnosno u uzorcima poput BAL-a ili sputuma.

Bolesnici s KOPB-om podijeljeni prema statusu krvnog tlaka, hipertenziji odnosno antihipertenzivnoj terapiji i normotenziji ne pokazuju promjene u koncentraciji citokina.

Statini u bolesnika s KOPB-om u ovom radu pokazali su utjecaj na smanjenje koncentracije citokina IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α u plazmi, kao i utjecaj na smanjenje relativnog udjela apoptoze leukocita odnosno subpopulacije limfocita i monocita u perifernoj cirkulaciji. Dakle, pokazano je pleiotropno djelovanje statina u KOPB-u. Ipak, tek treba ispitati da li je ovaj utjecaj statina izravan ili neizravan putem djelovanja na koncentraciju kolesterola i LDL-kolesterola. Prema GOLD-u, prisutne komorbiditete u bolesnika s KOPB-om treba liječiti kao da bolesnik nema KOPB (7). Stoga je primjena statina u bolesnika s KOPB-om indicirana samo u slučajevima hiperkolesterolemije i prevencije kardiovaskularnih događaja, te se smatra da statini samo u toj skupini bolesnika smanjuju rizik od egzacerbacija KOPB-a (184). Opservacijski radovi govore u prilog korištenju statina u bolesnika s KOPB-om, jer utječu na smanjenje egzacerbacija, morbiditeta i mortaliteta. Ali samo je jedna prospektivna studija pokazala da samo skupina bolesnika s KOPB-om i kardiovaskularnim rizikom ima koristi od primjene statina (10,151,184). Ipak, se smatra da bi imunomodulacijski učinci statina u bolesnika s kroničnim bolestima dišnih putova kao što su astma i KOPB, mogli imati terapijski potencijal (185). Nadalje, za odgovarajuću terapiju statinima važno je davanje dobro definirane doze statina, izbjegavanje nuspojava, predviđanje mogućih interakcija statina s drugim lijekovima, kao i farmakogenetski profil pojedinca (186).

KOPB je heterogena i kompleksna bolest te je potrebno razumijevanje staničnih i molekularnih mehanizama patogeneze KOPB-a kako bi bilo moguće otkriti adekvatne terapijske ciljeve za zaustavljanje napredovanja bolesti (187). Sidhaye i sur. smatraju kako je korištenje spirometrijskih pokazatelja nedovoljno za procjenu i predviđanje tijeka razvoja KOPB-a te da bi istovremeno mjerenje više molekula (genomika, transkriptomika, proteomika, glikomika, metabolomika, lipidomika) moglo doprinjeti razumijevanju promjena u KOPB-u (187). Također, smatraju da bi personalizirana medicina, prema kojoj se bolesnici sa sličnim dijagnozama razlikuju i procjenjuju

na temelju genskih, fenotipskih i psihosocijalnih karakteristika te biomarkera, mogla doprinjeti boljem odabiru terapije kod pojedinih bolesnika (187,188).

Citokini sudjeluju u patobiološkom procesu u bolesnika s KOPB-om, te imaju ulogu u kroničnoj upali, razvoju emfizema kao i u poremećajima urođene imunosti u KOPB-u (189,190). Dijagnostičko značenje citokina u KOPB-u se još uvijek ispituje, ali nekoliko autora smatra da mjerenje skupine odabranih citokina, a ne samo pojedinačnih citokina, može doprinjeti prepoznavanju bolesnika s težim stadijem KOPB-a (174). Specifičan tip upale prisutan u pojedinog bolesnika s KOPB-om s ekspresijom ključnih citokina i kemokina bi mogao omogućiti razvoj specifične anti-citokinske terapije pri ekspresiji toga citokina, te su potrebni izravni i neizravni biomarkeri abnormalne ekspresije citokina (191).

Ograničenje ove studije je nedostatak ispitivanja na skupinama zdravih pušača i nepušača. Za proučavanje utjecaja statina na koncentraciju citokina bilo bi prikladno imati skupine s kardiovaskularnim rizikom, s i bez KOPB-a. Druga ograničenja su da su bolesnici s KOPB-om uzimali različite vrste statina, pretežno simvastatin, ali i atorvastatin i rosuvastatin.

Kako bi se ispitalo dijagnostičko značenje citokina, buduća istraživanja trebala bi uključiti više bolesnika u stabilnoj fazi bolesti kao i u egzacerbacijama KOPB-a, ali i validirane metode za mjerenje koncentracije citokina. Potrebno je mjerenje više citokina odnosno panela određenih citokina u sistemskoj cirkulaciji, ali i lokalno u BAL-u ili sputumu, a ne samo pojedinačnih citokina kako bi se identificirali ključni citokini u KOPB-u te potencijalno anti-citokinske terapijske ciljeve. Pleiotropni učinci statina bi se trebali ispitati *in vitro* na različitim staničnim modelima, jer su istraživanja do sada pokazala da imaju različito djelovanje u različitim modelima bolesti. Nadalje, bilo bi od velike dijagnostičke koristi ispitati učinak statina na koncentraciju citokina i procese apoptoze u bolesnika s kardiovaskularnim oboljenjima s hiperkolesterolemijom *in vivo*, ali bez KOPB-a. Međutim, ispitati učinak statina na citokine u bolesnika s kardiovaskularnim oboljenjima, a drugu skupinu bolesnika s hiperkolesterolemijom prepustiti placebo učinku, bi bilo neetično, obzirom na sigurnost primjene statina (4).

6. ZAKLJUČCI

1. Koncentracije citokina IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α značajno su smanjene u plazmi bolesnika s KOPB-om koji su bili na terapiji sa statinima dulje od godinu dana u odnosu na bolesnike s KOPB-om bez terapije statinima.
2. Relativni udjeli svih leukocita, te subpopulacije limfocita i monocita u procesu apoptoze statistički su značajno smanjeni u bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima dulje od godine dana u odnosu na bolesnike s KOPB-om bez terapije statinima.
3. Hijerarhijska klasterijska analiza pokazala je nekoliko klastera u bolesnika s KOPB-om u skladu s vrijednostima citokina. Obrasci citokina – klasteri bili su u velikoj skupini bolesnika slični s umjerenim povećanjem vrijednosti citokina (klasteri A, B i C).
4. Bolesnici s KOPB-om koji su uzimali statine pokazali su različit obrazac/uzorak citokina s nižim vrijednostima citokina (klaster D).
5. Koncentracije citokina nisu pokazale značajnu razliku ovisno o podjeli bolesnika prema kliničkoj težini oboljenja tj. prema GOLD stadiju (A, B, C, D) prema revidiranoj GOLD klasifikaciji iz 2017.
6. Značajno smanjene koncentracije citokina IL-4, IL-8 i IL-10 su prisutne u bolesnika s KOPB-om s povišenim ITM-om ($> 25 \text{ kg/m}^2$) u odnosu na bolesnike s normalnim ITM-om ($20 - 25 \text{ kg/m}^2$).
7. Mjerenje panela citokina, a ne samo pojedinog citokina pruža uvid u karakteristične obrasce citokina u bolesnika s KOPB-om.
8. Postoji prisutan Th1 (IL-2 i TNF- α) i Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) citokinski obrazac kod stabilnih bolesnika s KOPB-om.

7. LITERATURA

1. Young RP, Hopkins RJ, Agusti A. Statins as adjunct therapy in COPD: how do we cope after STATCOPE? *Thorax*, 2014, 69, 891–894.
2. Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins: basic research and clinical perspectives. *Circ J*, 2010, 74, 818–826.
3. Churchward MA, Todd KG. Statin treatment affects cytokine release and phagocytic activity in primary cultured microglia through two separable mechanisms. *Mol Brain*, 2014, 7, 1–12.
4. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*, 2017, 120, 229–243.
5. Carlson AA, Smith EA, Reid DJ. The stats are in: An update on statin use in COPD. *Int J COPD*, 2015, 10, 2277–2284.
6. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*, 2009, 33, 1165–1185.
7. GOLD. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017. 2017. <https://goldcopd.org/gold-reports/>, pristupljeno 25. 11. 2018.
8. Rezk NA, Elewa A. Anti inflammatory effects of statin in COPD. *Egypt J Chest Dis Tuberc*, 2013, 62, 65–69.
9. Dobler CC, Wong KK, Marks GB. Associations between statins and COPD: a systematic review. *BMC Pulm Med*, 2009, 9, 1–12.
10. Young RP, Hopkins R, Eaton TE. Pharmacological actions of statins: Potential utility in COPD. *Eur Respir Rev*, 2009, 18, 222–232.
11. Janda S, Park K, FitzGerald JM, Etminan M, Swiston J. Statins in COPD: A systematic review. *Chest*, 2009, 136, 734–743.
12. Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2010, 86, 484–493.
13. Walsh A, Perrem LM, Elshafi M, Khashan AS, Henry M, Ni CM. Statins versus placebo for people with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 11, Art. No.: CD011959.
14. HALMED. Baza lijekova statini. HALMED. 2019.<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/#rezultati>, pristupljeno 28. 01. 2019.
15. Lipex 20 mg filmom obložene tablete.

- <https://medately.co/hr/drugs/4wf8JUV6eCG33TBRii5WbvWQH8C/lipex-20-mg-filmom-oblozene-tablete>, pristupljeno 28. 01. 2019.
16. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res*, 2014, 88, 3–11.
 17. Sičaja M. Primjena statina u kliničkoj praksi – temeljna rutina o kojoj sve znamo? *Medix*, 2016, 22, 162–165.
 18. HALMED. Sažetak opisa svojstava lijeka_H a l m e d. HALMED. 2018.<http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Lipex-80-mg-filmom-oblozene-tablete/12114/>, pristupljeno 28. 01. 2019.
 19. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic Effects of Statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45, 89–118.
 20. Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med*, 2001, 5, 378–387.
 21. Tietz NW. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd Edt. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 1999
 22. Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Similarities of T Cell Function In Cell-Mediated Immunity and Antibody Production. *Cell Immunol*, 1974, 12, 150–159.
 23. Roshene R, Ramesh A. Cytokines. *J Pharm Sci Res*, 2017, 9, 719–721.
 24. Čulo F. Citokini i kemokini. U: Imunologija. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, MARušić M, Taradi M, Višnjić D, eds., urednici, Zagreb: Medicinska Naklada, 2004, str. 123–138.
 25. Gulati K, Guhathakurta S, Joshi J, Rai N, Ray A. Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol*, 2016, 4, 1–9.
 26. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2001, 18, 50–59.
 27. Chung KF. Cytokines. U: Asthms and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management. Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI, Thomson NC, eds., urednici, New York, USA: Elsevier Ltd, 2009, str. 327–341.
 28. Agostini C, Saetta M, Semenzato G. Lymphocytes. U: Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management. Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI, Thomson NC, eds., urednici, London: Academic Press, An Elsevier Science Imprint, 2002, str. 119–130.
 29. Todd I, Spickett G, Fairclough L. Overview of the immune system. U: Immunology. Hoboken, USA: Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd, 2015
 30. Mélik-Parsadaniantz S, Rostène W. Chemokines and neuromodulation. *J Neuroimmunol*, 2008, 198, 62–68.

-
31. Zlotnik A, Yoshie O. The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*, 2012, 36, 705–712.
 32. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 2009, 84, 353–360.
 33. Dinarello CA. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood*, 1996, 87, 2095–2147.
 34. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family; Back to the Future. *Immunity*, 2013, 39, 1003–1018.
 35. Zou Y, Chen X, Liu J, Zhou D, Kuang X, Xiao J, Yu Q, Lu X, Li W, Xie B, Chen Q. Serum IL-1 β and IL-17 levels in patients with COPD: Associations with clinical parameters. *Int J COPD*, 2017, 12, 1247–1254.
 36. Pauwels NS, Bracke KR, Dupont LL, Van Pottelberge GR, Provoost S, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Lambrecht BN, Joos GF, Brusselle GG. Role of IL-1 α and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 β axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur Respir J*, 2011, 38, 1019–1028.
 37. Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep*, 2007, 8, 1142–1148.
 38. Dhupkar P, Gordon N. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. U: Immunotherapy. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 995. Naing A, Hajjar J, eds., urednici, Springer International Publishing, 2017, str. 33–51.
 39. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GAW, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of ‘alternatives’. *J Leukoc Biol*, 2012, 92, 753–764.
 40. Mueller TD, Zhang JL, Sebald W, Duschl A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 2002, 1592, 237–250.
 41. Bagnasco D, Ferrando M, Varricchi G, Passalacqua G, Canonica GW. A critical evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 strategies in severe asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 2016, 170, 122–131.
 42. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*, 1999, 17, 701–738.
 43. Takatsu K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2011, 87, 463–485.
 44. Chambliss JM, Sur S, Tripple JW. Asthma versus chronic obstructive pulmonary disease, the Dutch versus British hypothesis, and role of interleukin-5. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2018, 18, 26–31.
 45. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 2011, 1813,

878–888.

46. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6. doi:10.1101/cshperspect.a016295
47. Luo Y, Zheng SG. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front Immunol*, 2016, 7, 604.
48. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*, 1992, 307, 97–101.
49. Shahzad A, Knapp M, Lang I, Köhler G. Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker? *Int Arch Med*, 2010, 3, 11.
50. Barnes PJ. The Cytokine Network in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41, 631–638.
51. Pinto-Plata V, Casanova C, Müllerova H, De Torres JP, Corado H, Varo N, Cordoba E, Zeineldine S, Paz H, Baz R, Divo M, Cortopassi F, Celli BR. Inflammatory and repair serum biomarker pattern. Association to clinical outcomes in COPD. *Respir Res*, 2012, 13. doi:10.1186/1465-9921-13-71
52. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*, 2015, 74, 27–34.
53. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138, 16–28.
54. Vignali D a a, Kuchroo VK. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat Immunol*, 2014, 13, 722–728.
55. Zwirner NW, Ziblat A. Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27. *Front Immunol*, 2017, 8, 1–7.
56. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn T a, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A Immunol*, 1993, 90, 6115–6119.
57. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 2004, 153, 2533–2543.
58. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 2004, 75, 163–189.
59. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, 72, 3666–3670.

-
60. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, 25, 453–472.
 61. Lenk H, Tanneberger S, Muller U, Ebert J, Shiga T. Phase II clinical trial of high-dose recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989, 24, 391–392.
 62. Creaven P, Brenner D, Cowens JW, Huben R, Wolf R, Takita H, Arbuck S, Razack M, Proefrock A. A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor given daily for five days. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989, 23, 186–191.
 63. Falvo J V, Tsytsykova A V, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun*, 2010, 11, 27–60.
 64. Tsai EY, Yie J, Thanos D, Goldfeld AE. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol Cell Biol*, 1996, 16, 5232–5244.
 65. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel D V., Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: Structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13, 6361–6373.
 66. Calmon-Hamaty F, Combe B, Hahne M, Morel J. Lymphotoxin α revisited: General features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13, 2–6.
 67. WHO | Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). WHO. 2017.<http://www.who.int/respiratory/copd/en/>, pristupljeno 6. 06. 2018.
 68. De Boer WI. Perspectives for cytokine antagonist therapy in COPD. *Drug Discov Today*, 2005, 10, 93–106.
 69. Tudorić N, Pavičić F. Kronična opstruktivna plućna bolest. U: Interna medicina. Zagreb: Naklada Lijevak, 2003, str. 707–714.
 70. Popović-Grle S. Dijagnoza i liječenje kronične opstruktivne plućne bolesti. Pliva Zdr. 2015.<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26276/Dijagnoza-i-lijecenje-kronicne-opstruktivne-plucne-bolesti.html>, pristupljeno 12. 04. 2019.
 71. De Boer WI. Cytokines and therapy in COPD: A promising combination? *Chest*, 2002, 121, 209S–218S.
 72. MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2, 258–266.
 73. MacNee W. ABC of chronic obstructive pulmonary disease: pathology, pathogenesis, and pathophysiology. *BMJ Br Med J*, 2006, 332, 1202.
 74. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, 2014, 35, 71–86.

-
75. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*, 2004, 56, 515–548.
 76. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*, 2003, 22, 672–688.
 77. Drost EM, MacNee W. Neutrophils. U: Asthma and COPD. Basic Mechanisms and Clinical Management. Barnes PJ, Drazen JM, Rennard S TN, ed., urednici, 2002 Elsevier Ltd., 2002, str. 131–137.
 78. Tudorić N. Patofiziologija KOPB-a kao višekomponentne i multisistemske bolesti. *Medix*, 2006, 67, 64–67.
 79. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*, 2006, 61, 448–454.
 80. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1993, 92, 537–548.
 81. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153, 530–534.
 82. Barnes PJ. COPD and Asthma : Effects Beyond the Respiratory System. *Tanaffos*, 2012, 11, 9.
 83. Barnes PJ. Similarities and differences in inflammatory mechanisms of asthma and COPD. *Breathe*, 2011, 7, 229–238.
 84. Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghé B, Zuin R, Calabrese F, Casoni G, Maestrelli P, Papi A, Fabbri LM, Saetta M. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax*, 2004, 59, 308–312.
 85. Toews GB. Macrophages. U: Asthma and COPD. Basic Mechanisms and Cilinical Management. Barnes PJ, Rennard SI, Drazen JM, Thomson NC, eds., urednici, USA: Elsevier Ltd., 2009, str. 133–143.
 86. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*, 2004, 1, 59–70.
 87. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: Inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*, 2008, 31, 1334–1356.
 88. Atamas SP, Chapoval SP, Keegan AD. Cytokines in chronic respiratory diseases. *F1000 Biol Rep*, 2013, 5, 3.
 89. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallresco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers with

- chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160, 711–717.
90. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155, 852–857.
 91. Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the Airways and Lung Parenchyma in COPD: Role of T Cells. *Chest*, 2002, 121, 160S-165S.
 92. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152, 1666–1672.
 93. Hodge S, Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway granzyme b and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *COPD*, 2006, 3, 179–187.
 94. Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol*, 1997, 9, 87–92.
 95. Xu W-H, Hu X-L, Liu X-F, Bai P, Sun Y-C. Peripheral Tc17 and Tc17/Interferon- γ Cells are Increased and Associated with Lung Function in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129, 909–916.
 96. Matanić D, Flego V, Barković I, Zeba I, Kupanovac Ž, Bulat-Kardum L. Kronična opstruktivna plućna bolest – multisistemska bolest. *Med Flum*, 2009, 45, 60–64.
 97. Langen RC, Schols a M, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB J*, 2001, 15, 1169–1180.
 98. Wouters EFM, Creutzberg EC, Schols AMWJ. Systemic effects in COPD. *Chest*, 2002, 121, 127S-130S.
 99. Mundy GR. Osteoporosis and Inflammation. *Nutr Rev*, 2008, 65, S147–S151.
 100. Chatila WM, Thomashow BM, Minai OA, Criner GJ, Make BJ. Comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5, 549–555.
 101. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease: Effects beyond the lungs. *PLoS Med*, 2010, 7, 1–4.
 102. Burgel PR, Paillasseur JL, Caillaud D, Tillie-Leblond I, Chanez P, Escamilla R, Court-Fortune I, Perez T, Carré P, Roche N. Clinical COPD phenotypes: A novel approach using principal component and cluster analyses. *Eur Respir J*, 2010, 36, 531–539.
 103. Pelicarić D, Popović-Grle S. Fenotipovi KOPB-a. *Medicus*, 2016, 25, 81–89.
 104. Ajmera M, Shen C, Sambamoorthi U. Association Between Statin Medications and COPD-Specific Outcomes: A Real-World Observational Study. *Drugs - Real World Outcomes*, 2017, 4, 9–19.

-
105. Lee TM, Lin MS, Chang NC. Usefulness of C-Reactive Protein and Interleukin-6 as Predictors of Outcomes in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease Receiving Pravastatin. *Am J Cardiol*, 2008, 101, 530–535.
 106. Lyngdoh T, Vollenweider P, Waeber G, Marques-Vidal P. Association of statins with inflammatory cytokines: A population-based ColaUS study. *Atherosclerosis*, 2011, 219, 253–258.
 107. Frost FJ, Petersen H, Tollestrup K, Skipper B. Influenza and COPD Mortality Protection as Pleiotropic, Dose- Dependent Effects of Statins. *Chest*, 2007, 131, 1006–1012.
 108. Toews GB. Cytokines and the lung. *Eur Respir J Suppl*, 2001, 34, 3s-17s.
 109. Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2, 26–33.
 110. Paats MS, Bergen IM, Hoogsteden HC, Van Der Eerden MM, Hendriks RW. Systemic CD4+ and CD8+ T-cell cytokine profiles correlate with GOLD stage in stable COPD. *Eur Respir J*, 2012, 40, 330–337.
 111. Aaron SD, Vandemheen KL, Ramsay T, Zhang C, Avnur Z, Nikolcheva T, Quinn A. Multi analyte profiling and variability of inflammatory markers in blood and induced sputum in patients with stable COPD. *Respir Res*, 2010, 11:41, 1–12.
 112. Sapey E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, Stockley RA. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD. *J Clin Immunol*, 2009, 29, 508–516.
 113. Durham AL, Caramori G, Chung KF, Adcock IM. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease. *Transl Res*, 2016, 167, 192–203.
 114. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*, 2000, 55, 114–120.
 115. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med*, 2003, 97, 1299–1302.
 116. Kolsum U, Roy K, Starkey C, Borrill Z, Truman N, Vestbo J, Singh D. The repeatability of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein in COPD patients over one year. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2009, 4, 149–156.
 117. Ferrari R, Tanni SE, Caram LM, Corrêa C, Corrêa CR, Godoy I. Three-year follow-up of Interleukin 6 and C-reactive protein in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2013, 14, 1–7.
 118. Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, Okamura K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J*, 1999, 14, 309–314.

-
119. Hackett T-L, Holloway R, Holgate ST, Warner JA. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study. *Respir Res*, 2008, 9:47, 1–14.
 120. Zhan P, Wang J, Wei S-Z, Qian Q, Qiu L-X, Yu L-K, Song Y. TNF-308 gene polymorphism is associated with COPD risk among Asians: meta-analysis of data for 6,118 subjects. *Mol Biol Rep*, 2011, 38, 219–227.
 121. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, Dales RE. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163, 349–355.
 122. Oudijk E-JD, Lammers J-WJ, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2003, 22, Suppl., 5–13.
 123. Moermans C, Heinen V, Nguyen M, Henket M, Sele J, Manise M, Corhay JL, Louis R. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease. *Cytokine*, 2011, 56, 298–304.
 124. Studzinski GP. Overview of apoptosis. U: Apoptosis, a practical approach. 1st Edition. The Practical Approach Series. BD. SEH, ed., urednici, New York, USA: Oxford University Press Inc, 1999, str. 1–19.
 125. Žlender Vi. Apoptoza - programirana smrt stanice. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2003, 54, 267–274.
 126. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 2007, 35, 495–516.
 127. Kerr JF, Wyllie AH CA. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26, 239–257.
 128. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha A, Natale C, Santacroce R, Di Corcia M, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*, 2002, 21, 165–170.
 129. Henson PM, Tudor RM. Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294, L601–L611.
 130. Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R, Holmes M. Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285, L492–L499.
 131. Walsh GM. Defective apoptotic cell clearance in asthma and COPD - a new drug target for statins? *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 29, 6–11.
 132. Pletz MWR, Ioanas M, de Roux A, Burkhardt O, Lode H. Reduced spontaneous apoptosis in peripheral blood neutrophils during exacerbation of COPD. *Eur Respir J*, 2004, 23, 532–537.

-
133. Siena L, Gjomarkaj M, Elliot J, Pace E, Bruno A, Baraldo S, Saetta M, Bonsignore MR, James A. Reduced apoptosis of CD8⁺ T-Lymphocytes in the airways of smokers with mild/moderate COPD. *Respir Med*, 2011, 105, 1491–1500.
 134. Lim SC, Ju JY, Chi SY, Ban HJ, Kwon YS, Oh IJ, Kim KS, Kim Y Il, Kim YC. Apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood of patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Yonsei Med J*, 2011, 52, 581–587.
 135. Morimoto K, Janssen WJ, Fessler MB, McPhillips KA, Borges VM, Bowler RP, Xiao Y-Q, Kench JA, Henson PM, Vandivier RW. Lovastatin Enhances Clearance of Apoptotic Cells (Efferocytosis) with Implications for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Immunol*, 2006, 176, 7657–7665.
 136. GOLD. From the Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2015. 2015.<https://goldcopd.org>, pristupljeno 25. 04. 2015.
 137. Plavec D. Spirometrija-zlatni standard u ambulantnoj dijagnostici KOPB-a. *Medix*, 2006, , 75–78.
 138. Stojanovic N, Cvoriscec D, Rogic D. Primjena jednadžbi za procjenu klirensa kreatinina odnosno brzine glomerularne filtracije. *Biochem Medica*, 2005, 15, 1–8.
 139. Levey AS, Greene T, Kusek JW BG. MDRD Study Group: simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11, A0828.
 140. Labor Dr. Limbach und Kollegen H 2010. GFR nach vereinfachter MDRD Formel. 2010.<https://www.labor-limbach.de/laborrechner/labor-rechner/gfr-nach-vereinfachter-mdrd-formel/>, pristupljeno 15. 01. 2019.
 141. Stavrum AK, Petersen K, Jonassen I, Dysvik B. Analysis of Gene-Expression Data Using J-Express. *Curr Protoc Bioinforma*, 2008, 21, 7.3.1-7.3.25.
 142. Reikvam H, Mosevoll KA, Melve GK, Günther CC, Sjo M, Bentsen PT, Bruserud Ø. The Pretransplantation Serum Cytokine Profile in Allogeneic Stem Cell Recipients Differs from Healthy Individuals, and Various Profiles are Associated with Different Risks of Posttransplantation Complications. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012, 18, 190–199.
 143. Mosevoll KA, Akkök ÇA, Hervig T, Melve GK, Bruserud Ø, Reikvam H. Stem cell mobilization and harvesting by leukapheresis alters systemic cytokine levels in patients with multiple myeloma. *Cytotherapy*, 2013, 15, 850–860.
 144. Mosevoll KA, Skrede S, Lunde Markussen D, Fanebust HR, Flaatten HK, Abmus J, Reikvam H, Bruserud Ø. Inflammatory Mediator Profiles Differ in sepsis Patients With and Without Bacteremia. *Front Immunol*, 2018, 9, 691.
 145. Marevic S, Petrik J, Popovic Grle S, Cepelak I, Grgic I, Gorenc L, Stjepanovic G, Laskaj R, Zidovec Lepej S. Cytokines and statin therapy in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Scand J Clin Lab Invest*, 2018, 78, 533–538.

146. Tousoulis D, Psarros C, Demosthenous M, Patel R, Antoniadis C, Stefanadis C. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: The emerging role of statins. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63, 2491–2502.
147. Iwata A, Shirai R, Ishii H, Kushima H, Otani S, Hashinaga K, Umeki K, Kishi K, Tokimatsu I, Hiramatsu K, Kadota J. Inhibitory effect of statins on inflammatory cytokine production from human bronchial epithelial cells. *Clin Exp Immunol*, 2012, 168, 234–240.
148. Musial J, Undas A, Gajewski P, Jankowski M, Sydor W, Szczeklik A. Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *Int J Cardiol*, 2001, 77, 247–253.
149. Pereira MM, Sant'Ana Santos TP, Aras R, Couto RD, Sousa Atta MLB, Atta AM. Serum levels of cytokines and chemokines associated with cardiovascular disease in Brazilian patients treated with statins for dyslipidemia. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18, 66–70.
150. Kaczmarek P, Śladek K, Skucha W, Rzeszutko M, Iwaniec T, Dziedzina S, Szczeklik A. The influence of simvastatin on selected inflammatory markers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Arch Med Wewn*, 2010, 120, 11–18.
151. Criner GJ, Connett JE, Aaron SD et al. Simvastatin for the prevention of exacerbations in moderate-to-severe COPD. *N Eng J Med*, 2014, 370, 2201–2210.
152. Knobloch J, Chikosi S-J, Yanik S, Rupp J, Jungck D, Koch A. A systemic defect in Toll-like receptor 4 signaling increases lipopolysaccharide-induced suppression of IL-2-dependent T-cell proliferation in COPD. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*, 2016, 310, L24–L39.
153. Chung KF. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. *Lancet*, 2015, 386, 1086–1096.
154. Fu CH, Tsai WC, Lee TJ, Huang CC, Chang PH, Su Pang JH. Simvastatin inhibits IL-5-induced chemotaxis and CCR3 expression of HL-60-derived and human primary eosinophils. *PLoS One*, 2016, 11, 1–15.
155. El-Shimy W, El-Dib A, Nagy H, Sabry W. A study of IL-6, IL-8, and TNF- α as inflammatory markers in COPD patients. *Egypt J Bronchol*, 2014, 8, 91–99.
156. Shahriary A, Panahi Y, Shirali S, Rahmani H. Relationship of serum levels of interleukin 6, interleukin 8, and C-reactive protein with forced expiratory volume in first second in patients with mustard lung and chronic obstructive pulmonary diseases: Systematic review and meta-analysis. *Postep Dermatologii i Alergol*, 2017, 34, 192–198.
157. Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Müller MR, Husslein P, Kashanipour A, Minar E, Baghestanian M. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22, 1194–1199.
158. Dinarello C a. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol*, 2007, 37, S34–S45.

-
159. Maneechotesuwan K, Wongkajornsilp A, Adcock IM, Barnes PJ. Simvastatin Suppresses Airway IL-17 and Upregulates IL-10 in Patients With Stable COPD. *Chest*, 2015, 148, 1164–1176.
 160. Cimato TR, Palka BA. Effects of statins on TH1 modulating cytokines in human subjects. *PeerJ*, 2015, 3, e764.
 161. MacNee W. Systemic inflammatory biomarkers and co-morbidities of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Med*, 2013, 45, 291–300.
 162. Marevic S, Petrik J, Vrkic N, Popovic-Grle S, Zanic-Grubisic T, Cepelak I. TNF- alpha, CXCL8, big ET-1 and hsCRP in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Croat Chem Acta*, 2008, 81, 211–217.
 163. Gan WQ, 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, 574–580.
 164. Sarangi R, Varadhan N, Bahinipati J, Dhinakaran A, Anandaraj A, Ravichandran K. Serum uric acid in chronic obstructive pulmonary disease: A hospital based case control study. *J Clin Diagnostic Res*, 2017, 11, 9–13.
 165. Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće, specijalne i visokodiferentne medicinske biokemije. Zagreb: Medicinska Naklada, 2007
 166. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: Basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*, 2002, 110, 905–911.
 167. Ghavami S, Mutawe MM, Hauff K, Stelmack GL, Schaafsma D, Sharma P, Mcneill KD, Hynes TS, Kung SK, Unruh H, Klonisch T, Hatch GM, Los M, Halayko AJ. Statin-triggered cell death in primary human lung mesenchymal cells involves p53-PUMA and release of Smac and Omi but not cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803, 452–467.
 168. Chello M, Anselmi A, Spadaccio C, Patti G, Goffredo C, Di Sciascio G, Covino E. Simvastatin Increases Neutrophil Apoptosis and Reduces Inflammatory Reaction After Coronary Surgery. *Ann Thorac Surg*, 2007, 83, 1374–1380.
 169. Mandal P, Chalmers JD, Graham C, Harley C, Sidhu MK, Doherty C, Govan JW, Sethi T, Davidson DJ, Rossi AG, Hill AT. Atorvastatin as a stable treatment in bronchiectasis: A randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*, 2014, 2, 455–463.
 170. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol*, 2003, 81, 289–296.
 171. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: Implications in health and disease. *J Cell Biol*, 2010, 189, 1059–1070.

-
172. Gibson Wood W, Igbavboa U, Muller WE, Eckert GP. Statins, Bcl-2 and Apoptosis: Cell Death or Cell Protection? *Mol Neurobiol*, 2013, 48, 308–314.
 173. Zhang J, He J, Xia J, Chen Z, Chen X. Delayed apoptosis by neutrophils from COPD patients is associated with altered bak, bcl-xl, and mcl-1 mRNA expression. *Diagn Pathol*, 2012, 7, 65.
 174. Selvarajah S, Todd I, Tighe PJ, John M, Bolton CE, Harrison T, Fairclough LC. Multiple Circulating Cytokines Are Coelevated in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Mediators Inflamm*, 2016, ID 3604842, 1–9.
 175. Karadag F, Kirdar S, Karul AB, Ceylan E. The value of C-reactive protein as a marker of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Intern Med*, 2008, 19, 104–108.
 176. Dickens JA, Miller BE, Edwards LD, Silverman EK, Lomas DA, Tal-Singer R. COPD association and repeatability of blood biomarkers in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*, 2011, 12, 146.
 177. Bradford E, Jacobson S, Varasteh J, Comellas AP, Woodruff P, O’Neal W, DeMeo DL, Li X, Kim V, Cho M, Castaldi PJ, Hersh C, Silverman EK, Crapo JD, Kechris K, Bowler RP. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD. *Respir Res*, 2017, 18, 180.
 178. Han MK, Agusti A, Calverley PM et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182, 598–604.
 179. Koo H, Kang HK, Song P, Park HK, Lee S, Jung H. Systemic White Blood Cell Count as a Biomarker Associated with Severity of Chronic Obstructive Lung Disease. *Tuberc Respir Dis*, 2017, 80, 304–310.
 180. Faner R, Tal-Singer R, Riley JH et al. Lessons from ECLIPSE: A review of COPD biomarkers. *Thorax*, 2014, 69, 666–672.
 181. Nakamura M, Nakamura H, Minematsu N, Chubachi S, Miyazaki M, Yoshida S, Tsuduki K, Shirahata T, Mashimo S, Takahashi S, Nakajima T, Tateno H, Fujishima S, Betsuyaku T. Plasma cytokine profiles related to smoking-sensitivity and phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease. *Biomarkers*, 2014, 19, 368–377.
 182. Stapleton RD, Dixon AE, Parsons PE, Ware LB, Suratt BT. The association between BMI and plasma cytokine levels in patients with acute lung injury. *Chest*, 2010, 138, 568–577.
 183. Moy ML, Teylan M, Weston NA, Gagnon DR, Danilack VA, Garshick E. Daily step count is associated with plasma c-reactive protein and il-6 in a us cohort with COPD. *Chest*, 2014, 145, 542–550.
 184. So JY, Dhungana S, Beros JJ, Criner GJ. Statins in the treatment of COPD and asthma — where do we stand? *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 40, 26–33.

-
185. Thomson N. Clinical Studies of Statins in Asthma and COPD. *Curr Mol Pharmacol*, 2017, 10, 60–71.
 186. Bellosta S, Corsini A. Statin drug interactions and related adverse reactions: an update. *Expert Opin Drug Saf*, 2018, 17, 25–37.
 187. Sidhaye VK, Nishida K, Martinez FJ. Precision medicine in COPD: where are we and where do we need to go? *Eur Respir Rev*, 2018, 27, 1–15.
 188. Jameson L, Longo D. Precision Medicine — Personalized, Problematic, and Promising. *N Engl J Med*, 2015, 372, 2229–2234.
 189. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin Sci*, 2017, 131, 1541–1558.
 190. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D’Anna SE, Zanini A, Brun P, Casolari P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157, 316–324.
 191. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Fan Chung K. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J COPD*, 2014, 9, 397–412.

8. POPIS KRATICA

AIM	akutni infarkt miokarda
ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin-aminotransferaza
AMS	amilaza
APC	antigen-prezentirajuće stanice, <i>engl. antigen presenting cells</i>
AST	aspartat-aminotransferaza
BAL	bronhoalveolarni lavat
CAT	KOPB upitnik, <i>engl. COPD Assesment Test</i>
CCL	CC-kemokin ligand, <i>engl. CC-chemokine ligand</i>
CCR	receptor za CC-kemokine
CK	kreatin-kinaza
CRP	C-reaktivni protein
CRP	C-reaktivni protein
CTGF	čimbenik rasta vezivnog tkiva, <i>engl. connective tissue growth factor</i>
CXCL	CXC-kemokin ligand
CXCR	receptor za CXC-kemokine
DVT	duboka venska tromboza
eGFR	procjenjena glomerularna filtracija (<i>engl. estimated glomerular filtration rate</i>)
eNOS	endotelna dušikova oksidaza
ET-1	endotelin-1
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove, <i>engl. Food and Drug Administration</i>
FEV₁	forsirani izdisajni volumen u 1 sekundi
FPP	farnezipirofosfat
FVC	forsirani vitalni kapacitet
GDP	gvanozin-difosfat
GGPP	geranilgeranilpirofosfata
GGT	γ-glutamil-transferaza

GOLD	Globalna strategija za dijagnosticiranje, liječenje i prevenciju KOPB-a <i>engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
GRO-α	onkogen- α povezan s rastom, <i>engl. growth-related oncogene-α</i>
GTP	gvanozin-trifosfat
GTP-aza	gvanozin-trifosfataza
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
IFN-γ	interferon -gama
IL-10	interleukin -10
IL-12p70	interleukin -12p70
IL-1β	interleukin -1 -beta
IL-2	interleukin -2
IL-4	interleukin -4
IL-5	interleukin -5
IL-6	interleukin -6
IL-8 ili CXCL8	interleukin -8
IP-10	protein induciran interferonom- γ
I-TAC	T-stanični α -kemoatraktant induciran interferonom
ITM	indeks tjelesne mase
KOPB	kronična opstruktivska plućna bolest
LD	laktat-dehidrogenaza
LDL	lipoproteini niske gustoće, <i>engl. low density lipoproteins</i>
LDL-R	receptor za lipoproteine niske gustoće <i>engl. low density lipoprotein receptor</i>
LT	leukotrieni
LTB₄	leukotrien-B ₄
LT-α ili TNF-β	limfotoksin-alpha ili tumorski čimbenik nekroze-beta
MAPK	protein kinaze aktivirane mitogenom <i>engl. mitogen activated protein kinase</i>
MCH	prosječni sadržaj hemoglobina u eritrocitu (<i>engl. mean corpuscular hemoglobin</i>)

MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina u 1 L eritrocita (<i>engl. mean corpuscular hemoglobin concentration</i>)
MCP-1	monocitni kemotaktički protein -1
MCV	srednji volumen eritrocita (<i>engl. mean corpuscular volume</i>)
Mig	monokin induciran interferonom - γ
MMP	metaloproteinaza matriksa
mMRC	modificirana skala britanskog Medicinskog istraživačkog vijeća <i>engl. modified British Medical Research Council scale</i>
MPV	srednji volumen trombocita (<i>engl. mean platelet volume</i>)
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NF-κB	jezgreni čimbenik – kappa B
NO	dušik-II-oksidi
ox-LDL	oksidirani-lipoprotein niske gustoće (<i>engl. low density lipoprotein</i>)
PAI-1	inhibitor 1 aktivatora plazminogena
PG	prostaglandini
RDW	raspodjela eritrocita po volumenu (<i>engl. red cell distribution width</i>)
RHO	Rho kinaze
ROCK	Rho kinaze
ROS	reaktivni kisikovi spojevi, <i>engl. reactive oxygen species</i>
Tc1	T-citotoksične stanice-1, <i>engl. cytotoxic T-cells</i>
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta - β , <i>engl. transforming growth factor-β</i>
Th0	naivne T-pomagačke stanice, <i>engl. naive T-helper cells</i>
Th1	T -pomagačke stanice -1, <i>engl. T-helper cells</i>
Th17	T -pomagačke stanice -17, <i>engl. T-helper cells</i>
Th2	T -pomagačke stanice -2, <i>engl. T-helper cells</i>
TNF-α	tumorski čimbenik nekroze -alpha
TNF-β	tumorski čimbenik nekroze -beta ili limfotoksin -alpha (LT- α)
Treg	regulacijski T limfociti
UIBC	nezasićeni kapacitet vezanja željeza (<i>engl. unsaturated iron binding capacity</i>);

VC

vitalni kapacitet

VEGFvaskularni endotelni čimbenik rasta, *engl. vascular endothelial growth factor*

9. ŽIVOTOPIS

Sanja Marević rođena je 14.6.1976. u Rüsselsheimu, Njemačka. U Njemačkoj pohađa prva dva razreda osnovne škole, a nastavlja u Bjelovaru gdje i završava osnovnu školu. Prirodoslovno-matematičku gimnaziju je završila i maturirala u Bjelovaru, 1995. godine. Iste godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje je 2001. godine diplomirala i stekla naziv diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Poslijediplomski studij medicinske biokemije je upisala 2003. godine te je prešla na doktorski studij tijekom 2007. godine.

Od 2001. godine do danas radi u Odjelu za medicinsku biokemiju, hematologiju i koagulaciju s citologijom Klinike za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", u Zagrebu. Specijalizacijski staž je obavila u KBC "Sestre Milosrdnice" i položila specijalistički ispit iz medicinske biokemije 2008. godine.

Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB) i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM). Sudjelovala je aktivno u radu kao članica Ekonomskog povjerenstva HKMB-a, te u radu HDMBLM-a kao članica organizacijskog odbora kongresa 2nd EFLM-UEMS European Joint Congress - Laboratory medicine at the clinical interface, u Dubrovniku 2012. godine. Također je sudjelovala u radu Samostalnog sindikata medicinskih biokemičara Hrvatske, kao zamjenica Predsjednika.

Sudjelovala je u nastavi za specijalizante Infektologije u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević".

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i koautor više znanstvenih i stručnih članaka. Autor je i koautor više od 15 posterskih prezentacija.

Popis znanstvenih i stručnih članaka:

1. Marevic S, Petrik J, Popovic Grle S, Cepelak I, Grgic I, Gorenec L, Stjepanovic G, Laskaj R, Zidovec Lepej S. Cytokines and statin therapy in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Scand J Clin Lab Invest*, 2018, 78, 533-538.
2. Marević S, Petrik J, Vrkić N, Popović-Grle S, Žanić-Grubišić T, Čepelak I. TNF- α , CXCL8, big ET-1 and hsCRP in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Croat Chem Acta*, 2008, 81, 211-7.
3. Marević S, Petres B, Begovac J. Prevalencija seropozitivnosti na HIV u ostatnim serumima bolničkih laboratorija. U priručniku Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, *Druga generacija praćenja HIV infekcija i AIDS-a u Republici Hrvatskoj 2003-2006*, S9-12, 2006.
4. Marević S. Reaktivne promjene limfocita (pregled infektivnih bolesti s limfocitozom) i novosti u dijagnostici sindroma infektivne mononukleoze. U priručniku Tečaja za trajno usavršavanje Hrvatske komore medicinskih biokemičara *Laboratorijska dijagnostika poremećaja leukocitne loze, II.dio*, S21-33, 5. ožujak 2005.
5. Marević S, Petres B. Biokemijski pokazatelji oštećenja bubrega. *Infektološki glasnik*, 2004, 4, 207-21.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

PROTUUPALNI UČINCI STATINA U BOLESNIKA S KRONIČNOM OPSTRUKCIJSKOM PLUĆNOM BOLESTI

Sanja Marević

Uvod: Statini su inhibitori 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze koji se primjenjuju za smanjenje sinteze endogenog kolesterola kod pojedinih vrsta hiperlipoproteinemija. Međutim, statini pokazuju i pleiotropne učinke te se smatra da utječu na upalu, oksidacijski stres, oslobađanje citokina i apoptozu pojedinih staničnih vrsta. Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je kronična upalna bolest pluća sa sistemskom upalom te se smatra da bi lijekovi koji utječu na prisutni upalni proces mogli doprinjeti poboljšanju stanja u bolesnika s KOPB-om. Hipoteza ovoga istraživanja je da statini posjeduju protuupalni učinak koji bi mogao usporiti progresiju KOPB-a.

Metode: U istraživanje je bilo uključeno 100 bolesnika sa stabilnim KOPB-om, na terapiji statinima dulje od godinu dana (N=66) i bez terapije statinima (N=34). Svim bolesnicima je određena koncentracija citokina: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ , TNF- α i TNF- β u plazmi metodom protočne citometrije. Relativni udio apoptoze i nekroze leukocita odnosno subpopulacija granulocita, limfocita i monocita određen je također metodom protočne citometrije. Spirometrijski, biokemijski i hematološki parametri određeni su u svih bolesnika.

Rezultati: Citokini IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 i TNF- α pokazali su statistički značajno smanjenje koncentracije u bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima u odnosu na bolesnike s KOPB-om bez terapije statinima. Hijerarhijska klasterijska analiza pokazala je nekoliko klastera u bolesnika s KOPB-om u skladu s vrijednostima citokina. Citokinski uzorci bili su u velikoj skupini pacijenata slični s umjerenim povećanjem vrijednosti citokina. Bolesnici s KOPB-om koji su uzimali statine pokazali su različit obrazac/uzorak citokina s nižim vrijednostima citokina. Koncentracije citokina nisu pokazale statistički značajnu razliku ovisno o podjeli bolesnika prema težini oboljenja odnosno GOLD stadiju. Statistički značajno snižene koncentracije citokina IL-4, IL-8 i IL-10 su bile prisutne u bolesnika s KOPB-om s povišenim ITM-om (> 25 kg/m²) u odnosu na bolesnike s normalnim ITM-om (20 – 25 kg/m²). U perifernoj krvi relativni udio svih leukocita, te subpopulacije limfocita i monocita u apoptozu pokazali su statistički značajno smanjenje u bolesnika s KOPB-om na terapiji statinima u odnosu na bolesnike s KOPB-om bez terapije statinima.

Zaključak: Rezultati istraživanja pružaju uvid u pleiotropne učinke statina u bolesnika s KOPB-om. U ovom radu u bolesnika s KOPB-om, pored djelovanja statina na smanjenje koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola, pokazali smo i pleiotropne učinke statina na koncentracije citokina, koji su ključni medijatori lokalne i sistemske upale u KOPB-u, te na apoptozu leukocita periferne krvi. Mjerenje panela citokina, a ne samo pojedinog citokina, pruža uvid u karakteristične obrasce citokina u bolesnika s KOPB-om. Postoji prisutan Th1 (IL-2 i TNF- α) i Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) citokinski obrazac kod stabilnih bolesnika s KOPB-om.

Rad sadrži: 123 stranice; 24 slike; 16 tablica; 191 literaturnih navoda; izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: KOPB, statini, citokini, apoptoza

Mentori: red. prof. dr. sc. József Petrik, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
izv. prof. dr. sc. Sanja Popović-Grle, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenjivači: red. prof. dr. sc. Lada Rumora, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
prof. dr. sc. Vesna Bačić Vrca, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
dr. sc. Ivana Čepelak, profesor emerita

Rad je prihvaćen dana: 12. 6. 2019.

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 dissertation

ANTIINFLAMMATORY EFFECTS OF STATINS IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASES

Sanja Marević

Background: Statins are 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors used to reduce the endogenous cholesterol synthesis in some types of hyperlipoproteinemia. However, statins also show pleiotropic effects and are thought to affect inflammation, oxidative stress, release of cytokines and apoptosis of certain cell types. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic inflammatory disease of the lungs with systemic inflammation and it is considered that drugs that affect the present inflammatory process could contribute to improving the condition in patients with COPD. The hypothesis of this study is that statins possess an anti-inflammatory effect that could slow the progression of COPD.

Methods: The study included 100 patients with stable COPD, who received statin therapy for longer than one year (N = 66) and no statin therapy (N = 34). Cytokine concentration of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ , TNF- α and TNF- β was measured in plasma by flow cytometry. The relative percentage of apoptotic and necrotic leukocytes, populations of granulocytes, lymphocytes and monocytes was determined by flow cytometry. Spirometry, biochemical and hematological parameters were determined in all patients.

Results: Cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- α showed a statistically significant decrease of concentrations in patients with COPD on statin therapy compared to patients without statin therapy. Hierarchical cluster analysis showed several clusters in COPD patients in accordance with cytokine values. Cytokine patterns were in a large group of patients similar with a moderate increase in the cytokine levels. COPD patients who received statins showed a different pattern of cytokines with lower cytokine values. Cytokine concentrations did not show a statistically significant difference depending on the severity of the disease, according to GOLD stages. A statistically significant decrease of cytokine levels IL-4, IL-8 and IL-10 was present in patients with COPD with a body mass index (BMI) > 25 kg/m² compared to patients with normal BMI 20-25 kg/m². In peripheral blood, the relative percentage of all leukocytes, as well as the lymphocyte and monocyte subpopulations in apoptosis, showed a statistically significant decrease in COPD patients on statin therapy compared with COPD patients without statin therapy.

Conclusions: The results of the study provide an insight into pleiotropic effects of statins in patients with COPD. In our patients with COPD, the statins reduced cholesterol and LDL cholesterol levels, but we also demonstrated pleiotropic effects of statins on cytokines, both local and systemic inflammatory mediators in COPD as well as on apoptosis of peripheral blood leukocytes. The measurement of the cytokine panel, not just a single cytokine, provides an insight into cytokine patterns that are present in COPD patients. There is a Th1 (IL-2 i TNF- α) and Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) cytokine pattern present in stable COPD patients.

Dissertation includes: 123 pages; 24 figures; 16 tables; 191 references; the original is written in Croatian

Keywords: COPD, statins, cytokines, apoptosis

Supervisors: Full Professor József Petrik, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Associate Professor Sanja Popović-Grle, PhD, Faculty of Medicine, University of Zagreb

Reviewers: Full Professor Lada Rumora, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Professor Vesna Bačić Vrca, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Ivana Čepelak, PhD, professor emerita

Accepted: 12th June 2019.

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