

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja M. Dimić Janjić

POVEZANOST POKAZATELJA  
SISTEMSKE INFLAMACIJE I SISTEMA  
PROTEAZA/ANTIPROTEAZA SA  
FUNKCIONALNIM I KLINIČKIM  
KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA  
SA HRONIČNOM OPSTRUKTIVNOM  
BOLESTI PLUĆA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Sanja M. Dimić Janjić

INDICATORS OF INFLAMMATION  
AND PROTEASIS/ANTIPROTEASIS  
SYSTEM AND THEIR RELATION TO  
LUNG FUNCTION AND CLINICAL  
CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH  
CHRONIC OBSTRUCTIVE  
PULMONARY DISEASE

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2018

Mentor:

Prof. dr Branislava Milenković

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Violeta Mihailović-Vučinić

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Tatjana Simić

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Ivan Kopitović

Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## IZRAZI ZAHVALNOSTI

Ova doktorska disertacija je sprovedena u Klinici za pulmologiju Kliničkog centra Srbije pod mentorstvom Prof. dr Branislave Milenković.

Zahvaljujem se svojoj mentorki Prof. dr Branislavi Milenković na pomoći, podršci, savetima i konstruktivnom pristupu u svim fazama izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se članovima Komisije za izradu doktorske disertacije i članovima Komisije za odbranu doktorske disertacije na izvanrednoj saradnji Prof. dr Violeti Mihailović-Vučinić, Prof. dr Tatjani Simić, Prof. dr Ivanu Kopitoviću, Prof. dr Dragani Jovanović.

Zahvaljujem se kolektivu Odeljenja za molekularnu biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i Prof. Jeleni Kotur-Stevuljević.

Zahvaljujem se Respiratornom udruženju Srbije.

Zahvaljujem se kolektivu Odeljenja za funkcionalnu dijagnostiku Klinike za pulmologiju KCS.

Zahvaljujem se kolektivu Prvog kliničkog odeljenja Klinike za pulmologiju KCS.

*Zahvaljujem se mojoj porodici na podršci i ljubavi, posebno Goci i Nini na neizmernoj pomoći i razumevanju tokom izrade ove disertacije.*

# POVEZANOST POKAZATELJA SISTEMSKE INFLAMACIJE I SISTEMA PROTEAZA/ANTIPROTEAZA SA FUNKCIONALNIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA SA HRONIČNOM OPSTRUKTIVNOM BOLESTI PLUĆA

## **Rezime**

Uvod/Cilj: Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) predstavlja značajan javno zdravstveni problem u celom svetu jer su njena učestalost i posledice u stalnom porastu, naročito u zemljama sa značajnom populacijom pušača. Procene oboljevanja za 2010.godinu su ukazale na 384 miliona slučajeva HOBP uz godišnji mortalitet od 2,9 miliona ljudi [1-3]. Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) se karakteriše ograničenjem protoka vazduha koje nije potpuno reverzibilno. Ograničenje protoka vazduha je obično progresivno i udruženo sa poremećenim inflamacijskim odgovorom pluća na štetne čestice ili gasove [4,5]. Pacijente obolele od HOBP odlikuje stanje pojačane inflamacije i oksidativnog stresa, pojačane proteolize ekstracelularnog matriksa i neravnoteže u proteaza/antiproteaza sistemu, uz prateće patomorfološke promene u smislu destrukcije alveola i remodelovanje disajnih puteva. Multikomponentna priroda bolesti podrazumeva pored patoloških promena u disajnom stablu i plućima, i sistemske efekte sa zahvatanjem drugih organskih sistema: kardio-vaskularnog sistema, mišića i kostiju, metabolizma, kognitivnih svojstva i raspoloženja. Cilj ovog istraživanja je bio da se ispituju nivoi pokazatelja sistemske inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza i utvrdi njihova povezanost sa pokazateljima plućne funkcije i kliničkim karakteristikama pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća. Metod: Ovim istraživanjem su bili obuhvaćeni svi pacijenti sa dijagnozom hronične opstruktivne bolesti pluća koja je postavljena prema GOLD kriterijumima (engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Disease - GOLD) [1]) i lečeni su u periodu od maja 2017.godine do januara 2018.godine na Odeljenje za astmu, HOBP i hroničnu respiracijsku insuficijenciju Klinike za pulmologiju KCS. Učestvovalo je ukupno 98 ispitanika, starijih od 40 godina, pušači i bivši pušači, u stabilnoj fazi bolesti, bez drugog respiratornog oboljenja. Kontrolnu grupu je činilo 47 zdravih ispitanika uparenih po polu i godinama. Na pregledu je učinjeno ispitivanje plućne funkcije: spirometrija, difuzijski kapacitet za ugljen-monoksid (CO), telesna pletizmografija.

Ispitanici su popunili Upitnik za procenu HOBP (*engl.* COPD Assessment Test - CAT) i mMMR skalu za procenu stepena dispneje. Učinjeno je uzorkovanje krvi za kompletnu krvnu sliku, C reaktivni protein (CRP) i pokazatelje sistema proteaza/antiproteaza - matriksmetaloproteinazu 9 (MMP-9) i tkivni inhibitor matriksmetaloproteinaze 1 (TIMP-1). Rezultati: Ispitanici sa HOBP su imali značajno veće vrednosti MMP-9, TIMP-1 i odnosa MMP-9/TIMP-1 u poređenju sa zdravim ispitanicima, što ukazuje na disbalans u sistemu proteaza/antiproteaza, sa predominacijom proteolitičke aktivnosti. Ispitanici u stabilnoj fazi HOBP nisu imali povišene vrednosti pokazatelja inflamacije u serumu, ali su više vrednosti CRP, leukocita i neutrofila bile povezane sa višim vrednostima MMP-9 i TIMP-1. Nije bilo korelacije CRP i pokazatelja plućne funkcije. Postojala je negativna statistički značajna povezanost između MMP-9 i MMP-9/TIMP1 i spirometrijskih pokazatelja (FEV1/FVC, FVC, FEV1) i saturacije krvi kiseonikom. MMP-9 i MMP-9/TIMP1 je bila pozitivno povezana sa pokazateljima izmerenim telesnom pletizmografijom (TLC, ITGV, RV, RV%TLC) i negativno sa VC i IC). TIMP1 nije bio statistički značajno povezan sa pokazateljima spirometrije, difuzijskog kapaciteta za CO, saturacijom krvi kiseonikom i telesne pletizmografije, a MMP-9 i odnos MMP-9/TIMP-1 sa parametrima difuzijskog kapaciteta za CO. CAT skor je pozitivno, statistički značajno bio povezan sa MMP-9 i MMP-9/TIMP1, ali nije bilo povezanosti sa pokazateljima inflamacije. MMRC zbir je pozitivno, statistički značajno bio povezan sa MMP-9 i MMP-9/TIMP-1 i brojem neutrofila. Ispitanici u višem GOLD stadijumu (III i IV), imali veći stepen bronhoopstrukcije, hiperinflacije, oštećenja difuzije, obima simptoma, izraženiju dispneju uz disbalans u sistemu proteaza/antiproteaza. Zaključak: Pacijent sa HOBP imaju disbalans u sistemu proteaza/antiproteaza uz dominaciju proteolitičke aktivnosti. U ovom istraživanju je ukazano da postoji povezanost između inflamacije i ravnoteže u sistemu proteaza/antiproteaza.. Takođe pokazatelji sistema proteaza/antiproteaza su značajno povezani sa glavnim karakteristikama HOBP, a to su bronhoopstrukcija i hiperinflacija. Rezultati upućuju na moguću ulogu MMP-9 u patofiziološkom procesu nastanka i razvoja HOBP. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se mogla dokazati uloga MMP-9 kao eventualnog biomarkera za nastanak i razvoj HOBP.

Ključne reči: hronična opstruktivna bolest pluća, matriksmetaloproteinaze, inflamacija, sistem proteaza/antiproteaza, bronhoopstrukcija, hiperinflacija, emfizem.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Pulmologija

## INDICATORS OF INFLAMMATION AND PROTEASIS/ANTIPROTEASIS SYSTEM AND THEIR RELATION TO LUNG FUNCTION AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

### **Abstract**

**Introduction / Aim:** Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a significant public health issue with a constant increase in disease incidence, especially in countries with a significant population of smokers. Predictions for year 2010 were 384 million cases of COPD with an annual mortality of 2.9 million people [1-3]. Chronic obstructive pulmonary disease (HOBP) is characterized by a limitation of airflow that is not completely reversible. The limitation of airflow is usually progressive and associated with an abnormal inflammatory response to the fumes or gases [4,5]. Patients with COPD are characterized by a state of increased inflammation and oxidative stress, enhanced extracellular matrix degradation and imbalance in the proteasis/antiproteasis system, with accompanying pathomorphologic changes of alveolar destruction and airway remodeling. Multicomponent nature of the disease includes pathological changes in the respiratory tract, as well as systemic effects with the involvement of other organ systems: cardio-vascular system, osteoskeletal, metabolism, cognitive properties. The aim of this study was to assess the levels of systemic inflammation and the possible imbalance in protease / antiprotease system and to determine their relation to lung function parameters and clinical characteristics of patients with COPD.

**Method:** This study included all patients diagnosed with COPD according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Disease (GOLD) [1], and treated in the period from May 2017 to January 2018 in the Department of Asthma, COPD and chronic respiratory insufficiency in the Clinic for pulmonology, Clinical center of Serbia, Belgrade. Study included 98 subjects, aged 40 and over, smokers and former smokers, in a stable phase of COPD, with no other respiratory disease. Healthy control group included 47 subjects. All subjects completed pulmonary function testing (spirometry, diffusion capacity for carbon monoxide (CO), and body plethysmography), COPD Assessment Test (CAT) and the mMRC dyspnoea scale. They underwent blood sampling to obtain complete blood counts, C reactive protein



(CRP), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP 1). Results: Subjects with COPD had significantly higher MMP-9, TIMP-1 MMP-9 / TIMP-1 compared to healthy control, suggesting imbalance in the protease / antiprotease system, with prevalence of proteolytic activity. Subjects with stable COPD did not have elevated serum inflammatory markers, but higher CRP, leukocytes and neutrophils were related to higher values of MMP-9 and TIMP-1. There was a statistically significant negative relation between MMP-9 and MMP-9 / TIMP1 ratio with spirometric indicators (FEV1 / FVC, FVC, FEV 1) and blood oxygen saturation. MMP-9 and MMP-9 / TIMP1 ratio positively correlated with the indicators measured by body plethysmography (TLC, ITGV, RV, RV, RV% TLC and negatively with VC and IC). TIMP 1 was not significantly related to spirometry, diffusion capacity for CO, oxygen saturation and body plethysmography indicators. MMP-9 and MMP-9 / TIMP 1 ratio did not correlate with diffusion capacity for CO. The CAT score was significantly positively related to MMP-9 and MMP-9 / TIMP 1 ratio, but there was no correlation with indicators of inflammation. The MMRC score was significantly positively related to MMP-9 and MMP9 / TIMP 1 ratio and neutrophil number. Subjects with the higher GOLD stage (III and IV) had a higher degree of bronchoopstruction, hyperinflation, lower diffusion capacity, and higher level of symptoms with more pronounced disbalance in the protease / antiprotease system with pre-dominant proteolytic activity. Conclusion: COPD patients in this study demonstrated protease / antiprotease imbalance with the prevailing proteolytic activity, that correlated with inflammation and main characteristics of COPD – bronchoopstruction and hyperinflation. The results may indicate the possible role of MMP-9 and TIMP-1 in the pathophysiology of COPD. Further research is needed to explore possible role of MMP-9 and tIMP-1 as a potential COPD biomarkers.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, matrix metalloproteinase, inflammation, protease / antiprotease system, bronchoopstruction, hyperinflation, emphysema.

Scientific field: Medicine

Special topic: Pulmonology

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Etiopatogeneza hronične opstruktivne bolesti pluća i uloga hronične inflamacije.....	3
1.1.1. Ključne inflamatorne ćelije u HOBP.....	6
1.1.2. Funkcijske karakteristike pacijenata sa HOBP.....	11
1.1.3. Uloga sistema proteaza/antiproteaza u HOBP.....	12
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Ispitanici i dizajn.....	15
3.2. Pokazatelji plućne funkcije.....	18
3.3. Pokazatelji inflamacije i kompletna krvna slika.....	18
3.4. Pokazatelji sistema proteaza/antiproteaza.....	19
3.5. Statistička analiza.....	20
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	20
4.1. Deskriptivni pokazatelji.....	20
4.1.1. Osnovni demografski i klinički podaci.....	20
4.1.2. Ispitivanje plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza / antiproteaza.....	23
4.1.3. Pokazatelji inflamacije kod pacijenata sa HOBP.....	27
4.1.4. Pokazatelji sistema proteaza/antiproteaza kod pacijenta sa HOBP	

i u kontrolnoj grupi .....	28
4.1.5. Antropometrijski pokazatelji.....	33
4.2. Korelacije pokazatelja funkcijskih,kliničkih, inflamacijskih i pokazatelja sistema / antiproteaza.....	34
4.2.1. Korelacija između pokazatelja plućne funkcije, inflamacije i sistema preoteaza/ antiproteaza.....	34
4.2.2. Korelacija između pokazatelja inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza.....	43
4.2.3. Korelacija BMI sa funkcijskim i inflamatornim pokazateljima i matriks-metaloproteinazama.....	43
4.2.4. Korelaciju CAT i MMRC skora sa matrikmetaloproteinazama i inflamatornim pokazateljima.....	48
4.3. Ispitivanje prema kategorijama.....	51
4.3.1. Ispitivanje pokazatelja plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema GOLD stadijumima.....	51
4.3.2. Ispitivanje pokazatelja plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema CAT skoru.....	58
5. DISKUSIJA.....	66
6. ZAKLJUČAK.....	74
7. LITERATURA.....	86

# 1. UVOD

Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) predstavlja značajan javno zdravstveni problem u celom svetu jer su njena učestalost i posledice u stalnom porastu, naročito u zemljama sa značajnom populacijom pušača. Procene oboljevanja za 2010. godinu su ukazale na 384 miliona slučajeva HOBP uz godišnji mortalitet od 2,9 miliona ljudi [1-3]. Procene ukazuju da će do 2030. godine HOBP biti treći vodeći uzrok smrti u svetu, sa procenjenih 4.5 miliona smrti godišnje [4].

*Definicija:* Hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP) se karakteriše ograničenjem protoka vazduha koje nije potpuno reverzibilno. Ograničenje protoka vazduha je obično progresivno i udruženo sa poremećenim inflamacijskim odgovorom pluća na štetne čestice ili gasove [5]. Inflamacija disajnih puteva započinje u relativno ranoj fazi usled inhalacije štetnih čestica i gasova, najčešće duvanskog dima, i abnormalnog inflamatornog odgovora pluća, koji dovode do strukturalnih promena disajnih puteva. Pacijente obolele od HOBP odlikuje stanje pojačane inflamacije, oksidativnog stresa i disbalansa u sistemu proteaza/antiproteaza. Pušenje je najveći faktor rizika za nastanak oksidativnog stresa u plućima. Sa daljim tokom bolesti dolazi do destrukcije i strukturalnih promena disajnih puteva i parenhima pluća, koje utiču na pogoršanje plućne funkcije i promenljiv klinički tok bolesti. Usled ovih patoloških promena nastaju: bronhoopstrukcija, zarobljavanje vazduha i hiperinflacija, što u daljem toku još više doprinosi oštećenju plućne funkcije.

*Faktori rizika:* Bolest nastaje usled složenih interakcija genetskih i sredinskih faktora, a zbog dugotrajnog delovanja faktora rizika iz spoljne sredine i organizma, kao i poremećaja rasta i razvoja pluća, profesionalne ekspozicije organskim i neorganskim supstancijama i gasovima, aerozagađenja, čestih respiratornih infekcija u detinjstvu i lošijeg ekonomskog stanja [6]. U većini slučajeva ipak HOBP nastaje kao posledica pušenja.

*Klinički kriterijumi:* Dijagnoza HOBP se postavlja na osnovu podataka iz anamneze o izloženosti faktorima rizika, postojanju simptoma i spirometrijskoj potvrdi bronhoopstrukcije. Osnovni simptomi koji ukazuju na postojanje HOBP su nedostatak vazduha (dispneja), hronični kašalj i hronična produkcija sputuma.

Dispneja je primarni simptom i najčešći razlog za javljanje lekaru. Subjektivni doživljaj, fiziološki i psihološki faktori kao i individualne i kulturološke razlike utiču na to kako će oboleli opisati dispneju: glad za vazduhom, otežno disanje, gušenje, nedovoljan udah [7,8]. Kašalj inicijalno može biti intermitentan, kasnije je često prisutan svakodnevno, čak i tokom celog dana i može biti produktivan. Uz simptome koji karakterišu ovo oboljenje, kod pacijenata sa HOBP se javlja i opšta slabost, gubitak u telesnoj težini (plućna kaheksija), atrofija skeletnih mišića, poremećaji spavanja, hroničan bol i anksioznost [9-12]. Usled umanjenih fizičkih sposobnosti i neaktivnosti dolazi do značajnih promena u kvalitetu života pacijenta sa HOBP. U poodmaklim fazama bolesti razvija se značajan stepen zavisnosti od drugih čak i u svakodnevnim aktivnostima. Pomenuto se povezuju i sa nastankom depresije kod ovih pacijenata. Opterećenje bolešću dodatno podstiču i komorbiditeti, a najčešće su: kardiovaskularni komorbiditeti (srčana insuficijencija, ishemijska bolest srca, aritmije, hipertenzija, periferna vaskularna bolest), karcinom pluća, osteoporoza, depresija i anksioznost, gastroezofagealni refluks, metabolički sindrom i dijabetes, bronhiektazije i opstruktivna apneja u snu [13].

*Fenotipovi:* Hronična opstruktivna bolest pluća se manifestuje kroz različite fenotipove, a prvi definisani fenotipovi bili su fenotip “blue bloatera” i “pink puffer” tj. fenotip hroničnog bronhitisa i emfizema. Hronični bronhitis se klinički definiše kao produktivni kašalj tokom većeg broja dana u mesecu, najmanje 3 meseca u godini, u poslednje dve ili više godina. Emfizem pluća je abnormalno uvećanje vazdušnih prostora distalno od terminalnih bronhiola usled destrukcije zida alveola i bez jasne fibroze. U novijoj studiji *Miravittles et al.* identifikuje tri osnovna fenotipa HOBP kao: (1) “overlap” ili mešani HOBP-astma; (2) egzacerbator i (3) emfizem-hiperinflacija [14]. Mešani fenotip u HOBP se definiše kao bronhoopstrukcija koja nije kompletno reverzibilna i udružena je sa simptomima i znacima povećane reverzibilnosti bronhoopstrukcije [15]. Fenotip egzacerbatora se definiše kao oni pacijenti sa HOBP koji imaju dve ili više egzacerbacija godišnje. Emfizem –hiperinflacija fenotip definiše pacijente sa HOBP kod kojih su dispneja i intolerancija napora dominantni simptomi i najčešće ih prate znaci hiperinflacije [14].

*Dijagnostičke metode:* Spirometrijsko ispitivanje plućne funkcije je najvažnija metoda za dijagnostikovanje HOBP, a potvrda oboljenja je postbronhodilatacijski odnos forsiranog ekspirijumskog volumena u prvoj sekundi i forsiranog vitalnog kapaciteta, FEV<sub>1</sub>/FVC manji od 70% . Pacijenti sa HOBP se klasifikuju na osnovu opterećenja simptomima, stepena bronhopstrukcije i broja egzacerbacija. Opterećenje i intenzitet simptoma se najčešće procenjuje primenom MMRC skale dispneje (engl. The Medical Research Council (MRC)) i/ili upitnikom za procenu HOBP (engl. COPD Assessment Test - CAT). Stepen bronhopstrukcije se definiše na osnovu stepena ostvarene vrednosti FEV1 i deli se na blagu, umerenu tešku i veoma tešku HOBP. Egzacerbacija HOBP je definisana kao akutno pogoršanje respiratornih simptoma koje zahteva dodatnu terapiju. Najčešći razlog egzacerbacija su infekcije respiratornog trakta. Broj i težina pogoršanja utiču na bržu progresiju bolesti sa daljim oštećenjem plućne funkcije kao i mortalitet ovih pacijenata.

Prevenција HOBP je usmerena ka izbegavanju izloženosti faktorima rizika, a optimalno lečenje obuhvata: izbegavanje faktora rizika, farmakološku terapiju, respiratornu rehabilitaciju, nefarmakološke mere i u pojedinim slučajevima hiruško lečenje. Cilj lečenja HOBP podrazumeva i prevenciju egzacerbacije, umanjeње negativnog efekta aktuelne egzacerbacije, kao i odlaganje vremena do sledeće egzacerbacije.

### **1.1. Etiopatogeneza hronične opstruktivne bolesti pluća i uloga hronične inflamacije**

Pacijente obolele od HOBP odlikuje stanje pojačane inflamacije i oksidativnog stresa, pojačane proteolize ekstracelularnog matriksa tj. neravnoteže u proteaza/antiproteaza sistemu, i prateće patomorfološke promene u smislu destrukcije alveola i remodelovanje disajnih puteva. Multikomponentna priroda bolesti podrazumeva pored patoloških promena u disajnom stablu i plućima, i sistemske efekte sa zahvatanjem drugih organskih sistema: kardio-vaskularnog sistema, mišića i kostiju, metabolizma, kognitivnih svojstva i raspoloženja. Interakcija navedenih poremećaja, koji prouzrokuju kako plućne, tako i sistemske

efekte je kompleksna, procesi su međusobno zavisni i interreaguju formirajući “začarani krug.”

Inflamacija disajnih puteva započinje u relativno ranoj fazi usled inhalacije štetnih čestica i gasova, najčešće duvanskog dima, i abnormalnog inflamatornog odgovora pluća, koji dovode do strukturalnih promena disajnih puteva. Pušenje je glavni faktor rizika za nastanak HOBP, međutim samo 15-20% pušača oboli od HOBP, a hronična inflamacija u disajnim putevima perzistira i nakon prestanka pušenja [16]. Pluća su jedan od najimunogenijih organa i permanentno su izložena raznovrsnim spoljasnijim uticajima. Inflamatorni proces u plućima je heterogen uz učešće i urođenog i stečenog imuniteta, i obuhvata promene u parenhimu (emfizem), remodelovanje u disajnim putevima kao i promene u malim disajnim putevima. Uprkos definiciji da emfizem nastaje distalno od terminalnih bronhiola usled destrukcije zida alveola, novije pretpostavke govore o terminalnoj bronhioli kao primarnom mestu destrukcije. Partikule gasa koje su manje od  $<0.5 \mu\text{m}$  mogu dospeti do partija disajnih puteva gde se usporava protok i započinje difuzija, a kako su skoro 1000x veće od molekula kiseonika sa značajno manjim difuzionim kapacitetom [17], veća je verovatnoća je da će se deponovati u tranzitnim regionima disajnih puteva obzirom da nemaju mogućnost da difunduju dublje u alveolarne prostore. Dodatno ukoliko uzmemo u obzir da je površina terminalne bronhiole mnogo manja od respiratorne bronhiole odakle se nadalje alveole pojavljuju, ukazuje da je doza partikula po jedinici površine disajnog puta veća u terminalnoj nego respiratornoj bronhioli.

Hipotezu da su terminalne bronhiole primarno mesto za tkivnu destrukciju u HOBP podržavaju i podaci dobijeni micro CT-om, gde se uočava da se destrukcija terminalne bronhiole dešava pre početka emfizemskih promena. Ovo zapažanje je dodatno uslovljeno činjenicom da u terminalnim bronhiolama dolazi do akumuliranja toksičnih partikula, jer manje partikule koje dospevaju u tranzitne regione imaju tendenciju da tu i ostanu, jer nemaju mogućnost difundovanja u dublje partije pluća. [18,19].

Remodelovanje disajnih puteva u HOBP karakteriše hipertrofija mukoznih žlezda i povećanje broja peharastih ćelija više u centralnim disajnim putevima,

peribronhijalna fibroza u perifernijim disajnim putevima, uz suženje lumena [20], redukciju broja i akumulaciju lumenskog inflamatornog eksudata u malim disajnim puteva..

Hipesekrecija mukusa je definišuća karakteristika hroničnog bronhitisa. Posledica je inflamacije u submukoznim žlezdama [21] i može odražavati intenzitet inflamacije u preifernim disajnim putevima. Hipersekrecija mukusa je potencijalni faktor rizika za ubzano opadanje plućne funkcije [22,23] najverovatnije usled povećanog rizika od egzacerbacije.

Emfizem pluća je abnormalno uvećanje vazdušnih prostora distalno od terminalnih bronhiola usled destrukcije zida alveola i bez jasne fibroze. Razlikujemo četiri najčešća tipa emfizema: centroacinusni, panacinusni, paraseptalni (distalno acinarni) i mešanih karakteristika tj. iregularan. Centroacinusni karakteriše dilatacija i destrukcija respiratorne bronhiole i uglavnom zahvata gornje lobuse [24]. Kod panacinusnog emfizema ceo acinus je ravnomerno zahvaćen i dominantno je u donjim lobusima i najčešće je udružen sa deficitom alfa 1 antitripsina. Paraseptalni ili distalno acinarni je lokalizovan na periferiji lobulusa duž lobularne septe, najizraženiji je u subpleuralnom regionu i često predisponira nosioca za nastanak spontanog pneumotoraksa [25]. Mešani ili iregularni emfizem je kombinacija svih pomenutih tipova emfizema i najčešće se javlja oko ožiljnog tkiva.

U malim disajnim putevima dolazi do zadebljanja zida, formacije limfoidnih folikula i deponovanja kolagena u spoljnim delovima zida koja dovode do restrikcije u otvaranju disajnog puta. [26]. Opstrukcija u malim disajnim putevima i zadebljanje zida se odvija u procesu remodelovanja u cilju reparacije tkiva, disfunkcije urođenog imuniteta u smislu neadekvatnog mukocilijanog klirensa i akumulacije inflamatornog eksudata u lumenu. Zapaženi porast limfocita i njihovo organizovanje u limfoidne folikule, koji su značajna histološka karakteristika HOBP, može se povezati i sa odgovorom stečenog imuniteta na kolonizaciju i infekciju [27].

Nasuprot dosadašnjem uvraženom stavu, pluća ipak nisu "sterilna"[28]. Kod zdravih u plućima postoji prilično bogata mikrobna flora [29]. Novije studije u



kojima su upražnjavane tehnike identifikacije bakterija bazirane na sekvencioniranju su ukazale na prisustvo konzistentnog i raznovrsnog bakterijskog signala u plućima zdravih osoba [30,31]. Studije sekvencioniranja na tkivu pacijenata sa HOBP su ukazale na porast u *Firmicutes* gupi u teškoj HOBP (GOLD stadijum 4) najverovatnije usled porasta u *Lactobacillus* rodu [32]. Fagocitoza u *Lactobacillus spp* od strane humanih makrofaga umanjuje efekat pušenjem izazavane inflamacije, što potencijalno ukazuje da bi ovi sojevi mogli imati povoljan uticaj na pušenjem indukovane plućne bolesti [33].

Istovremeno se dešavaju i promene u plućnoj vaskulaturi u smislu destrukcije i gubitka kapilarnog korita kod emfizema i intimalne hipertrofije usled hipoksične vazokonstrikcije [34], kao endotelne disfunkcije [35] i koagulopatije sa konačnim razvojem plućne hipertenzije i hroničnog plućnog srca.

Mehanizmi ozlede u HOBP su očigledno multifaktorijalni. Mehanizam ozlede tkiva u HOBP najverovatnije nastaje usled procesa reparacije nakon ponavljajnih inhalacionih ozleda tkiva. Reparacija tkiva nakon ponavljajnih ozleda i nakon pojedinačne ozlede značajno se razlikuje, jer u drugom slučaju inflamatorni proces se zaustavlja nakon migracije fibroblasta koji učestvuju u formiranju trajnog ožiljka. Kod ponavljajnih ozleda inflamatorni proces i destrukcija tkiva se nastavlja i dolazi do abnormalnog ožiljavanja (fibroza) [36,37].

### **1.1.1. Ključne inflamatorne ćelije**

Nekoliko različitih tipova ćelije učestvuje u inflamaciji u HOBP, a najvažnije su makrofagi, neutrofil i T limfociti. Oslobađaju se brojni inflamatorni medijatori (citokini, hemokini, faktori rasta), uz dodatne efekte oksidativnog stresa i aktivnost elastolitičkih enzima i proteaza [38].

*Makrofagi* su heterogena populacija ćelija urođenog imunskog sistema, koja svojom sposobnošću fagocitoze učestvuje u neutralizaciji mikroorganizama, proizvodi inflamatorne i antinflamatorne molekule, citokine, proteaze i inhibitore proteaza i učestvuje kako u inflamaciji i ozleđivanju tkiva, tako i u rezoluciji inflamacije i

zarastanju rana. Takođe ispoljavaju i anti-inflamatorni efekat sposobnošću apoptoze [39,40]. Doprinosu stečenom imunitetu kao antigen prezentujuće ćelije koje potom stimulišu T limfocite. Polarizacija makrofaga se karakteriše kroz dva najdominantnija fenotipa: proinflamatorni M1 i anti-inflamatorni M2 mada se izvesna uloga pridaje i intermedijarnim fenotipovima. Makrofagi u disajnim putevima bivaju aktivirani duvanskim dimom, sekretuju različite inflamatorne medijatore i na taj način je moguće da orkestriraju inflamatorni proces u plućima. U plućima u anatomskom smislu možemo razlikovati alveolarne i intersticijske makrofage [39]. Postoji značajan porast makrofaga (5 do 10 puta) u disajnim putevima, parenhimu, BAL i sputumu pacijenta sa HOBP, i njihov broj korelira sa stepenom težine HOBP [39]. Ovaj porast se može objasniti povećanom mobilizacijom, lokalnom proliferacijom ili lokalnim preživljavanjem. Mogući efekti makrofaga na inflamaciju u HOBP mogu se objasniti povećanim otpuštanjem reaktivnih oksigenih intermedijata ROIs) i reaktivnih azotnih intermedijata(RNIs). Takođe alveolarni makrofagi pacijenta sa HOBP usled održavanja aktivnosti, mogu proizvesti povećanje izvesnih matriksmetaloproteinaza (MMP 9, MMP 12) [41], ali i IL-8/CXCL8 [42]. Mogući mehanizam odnosi se i na narušenu sposobnost fagocitoze makrofaga pacijenta sa HOBP [43-45], ali i apoptoze najpre neutrofila koji ukoliko se ne uklone, sekundarno nekrotišu i oslobađaju brojne toksične supstance koje pouzrokuju ozledu tkiva. *Hodge et al.* su ukazali da alveolarni makrofagi pacijenata sa HOBP imaju umanjenu sposobnost da ingestiraju apoptotične epitelijalne ćelije u odnosu na nepušače [46,47]. Alveolarni makrofagi u HOBP su se pokazali rezistentnim na anti-inflamatorni efekat kortikosteroida, što se povezuje sa smanjenom aktivnošću i ekspresijom histon deacetylase 2 [48].

*Neutrofilija* u disajnim putevima je u korelaciji sa brzinom opadanja plućne funkcije [49], neutrofilija u sputumu je u korelaciji sa CT indikatorima disfunkcije perifernih disajnih puteva kod pušača [50], a neutrofilna inflamacija se javlja i u egzacerbaciji HOBP[51]. Ekspozicija inhalacionim agensima spoljne sredine (duvanski dim, zagađenje, infektivni agensi) utiče na oslobađanje hemoatraktansa iz epitelnih ćelija i alevolarnih makrofaga, što sveukupno podstiče mobilizaciju neutrofila [52]. Disfunkcija makrofaga u smislu nedaekvatne efferocitoze i fagocitoze, uz pojačanu mobilizaciju neutrofila, može doprineti njihovoj pojačanoj

akumulaciji u disajnim putevima i plućima [53]. Neutrofili sadrže četiri tipa granula: primarne (azurofilne), sekundarne specifične, tercijerne (želatinozne) i sekretorne vezikule. Diferencijacija u kostnoj srži, a kasnije i degranulacija se odvijaju hijerarhijski, sa tim što se poslednje formirane sekretorne vezikule najlakše mobilizuju [54]. Azurofilne granule koje sadrže NE, katepsin, proteinazu-3, i većinu histiotoksičnih proteaza, zahtevaju najpotentniji stimulus za signifikantnu degranulaciju. Međutim neutrofili koji su prajmirani (tranziciono stanje u kome neutrofili postanu osetljiviji na stimulus koji ih aktiviraju) na izloženost citokinima [55] ili hipoksiji [56] imaju dramatičnije izraženu degranulaciju kao odgovor na stimulaciju, a sam prajming naglašava destruktivni potencijal neutrofila. Pokazano je da su cirkulišući neutrofili pacijenata sa HOBP prajmirani [57], i da se prajming uočava naročito tokom egzacerbacije [58]. Isti mehanizmi utiču na oslobađanje Myeloperoksidase (MPO) i NE [59], a MPO indukuje oksidativni stress u stanjima inflamacije naročito u prisustvu duvanskog dima [60-62]. Matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9), poznata i kao želatinaza B ili neutrofilna kolagenaza je prisutna u želatinoznim granulama, i zajedno sa drugim MMP, učestvuje u razlaganju glavnih strukturalnih komponenta ekstracelularnog matriksa kao što su: kolagen, laminin i želatin. Na taj način pospešuje i dalju ekstravazaciju i migraciju neutrofila u kontrolisanim uslovima [63, 64], ali sa potencijalom za značajnu ozledu tkiva u slučaju nekontrolisanog oslobađanja. Hipoksija koja se javlja kod pacijenata sa HOBP ima značajan uticaj na neutrofile, a neutrofili koji su bili izloženi fiziološkim nivoima hipoksije *in vitro* pokazali su dramatično duže preživljavanje [65]. Takođe mehanizmi koji regulišu adheziju i transmigraciju neutrofila između sistemske i plućne cirkulacije se razlikuju, što može objasniti različita svojstva neutrofila koji dolaze iz alveolarnih i bronhijalnih kompartnata.

*Limfociti.* Pušenje, infektivni agensi, razgradni produkti, tkivni antigeni mogu uticati na stečeni imunski odgovor u plućima pacijenata sa HOBP uz učešće citotoksičnih CD8+ T ćelija, T helper 1 and Th17 CD4+ ćelija [66,67], i B ćelijskog odgovora na produkciju antitela. Broj plućnih CD8+ T ćelija postepeno raste sa većim stepenom bronhoopstrukcije i emfizemom. [68]. Nakon aktivacije CD8+ T limfociti oslobađaju proteolitčke enzime kao što je perforin i granzim, koji

prouzrokuje smrt strukturalnih ćelija apoptozom ili nekrozom. U studiji *Kim et al.* [69] pokazano je da je up-regulacija granzima B u CD8(+) i non-CD8(+) ćelijama je rani fenomen remodelovanja malih disajnih puteva u centrilobularnom emfizemu, što govori u prilog moguće uloge u patogenezi HOBP. U plućima pušača sa HOBP povećan je broj CD4+ ćelija. U plućima pacijenata sa stabilnom HOBP akumuliraju se dva tipa CD4+ ćelija, Th1 and Th17 [70,71]. Th1 ćelije sekretuju više interferona (INF  $\gamma$ ), dok Th17 ćelije regulišu inflamaciju produkcijom IL-17A and IL-17F [72]. Broj B ćelija je povećan u velikim disajnim putevima pacijenta sa HOBP. Peribronhijalni limfoidni folikuli su organizovani u procesu limfoidne neogeneze [73] u T i B-ćelijskim kompartmentima preko limfoidnih hemokina CCL19, CCL21, CXCL12 i CXCL13 [74] Hemokin koji privlači B-ćelije CXCL13 je važan medijator u formiranju tecijarnih limfoidnih organa. U novijoj studiji *Litsiou et al.* [75] pokazano je da je formiranje limfoidnih folikula u HOBP vođeno aktivnošću B ćelija preko CXCL13-zavisnih mehanizama koji uključuju i signalne puteve preko Toll-like receptora i limfotoksinskih receptora.

*Bronhijalne epitelne ćelije (BEC)* se na osnovu strukturnih, funkcijskih i biohemijskih karakteristika dele na: bazalne, cilijarne i sekretorne ćelije. BEC čine efikasnu fizičku barijeru od virusne invazije, a cilijarne i mukusne ćelije stvaraju mukusnu barijeru koja zarobljava skoro 90% inhaliranih partikula [76,77]. BEC pepoznaju molekularne šablone udružene sa patogenom (engl. pathogen-associated molecular patterns (PAMP), ekspresijom receptora za poseban šablon (engl. pattern recognition receptors (PRR) kao što su Toll-like receptori. Pušenje u značajnoj meri menja epitelijalnu arhitektoniku i narušava funkciju barijere BEC tako što povećava permeabilnost epitela disajnih puteva, narušava funkcionalnost cilija i mukocilijarnog klirensa. Ovakva disfunkcija barijere se učestalo viđa u HOBP, [78] BEC stvaraju primane inflamatorne medijatore, a potom stimulišu oslobađanje sekundarnih medijatora kao što su različiti citokini, lipidni medijatori, faktori rasta, proteaze, ROS [79]. Bronhijalne epitelne ćelije (BEC) doprinose inlamaciji u plućima koja je posredovana oksidativnim stresom. BEC su izložene egzogenim oksidansima kao što je duvanski dim, koji indukuje produkciju ROS i smanjenje nivoa i odbrambenih mehanizama antioksidansa, što ukupno vodi u pojačanu ekspresiju inflamatornih medijatora i konačno influks inflamatornih ćelija u disajne

puteve. Oksidativni stres narušava integritet i protektivni kapacitet BEC, što dodatno pojačava inflamaciju.

*Dendritične ćelije (DC)* su značajna veza između urođenog i stečenog imuniteta. Nezrele DC formiraju mrežu u različitim slojevima mukoze disajnih puteva, a nakon prepoznavanja antigena (Ag) u smislu signala udruženih sa patogenom ili ozledom dolazi do njihove maturacije i migriranja ka drenažnom limfnom čvoru. Zrele DC prezentuju obrađen antigen Glavnom Kompleksu Histokompatibilnosti (engl. Major Histocompatibility Complex (MHC)) i intereaguju sa naivnim T limfocitima kako bi formirali imunološke sinapse, selektujući T ćelije koje će targetirati prezentovan Ag sa specijalizovanim efektorskim funkcijama. Ovakva pozicija omogućava DC da orkestriraju jačinu i prirodu odgovora stečenog imuniteta na različite antigene [80,81]. Tokom migracije DC čine up-regulaciju ekspresije kostimulatornih molekula na njihovj ćelijskoj površini u procesu koji je označen kao maturacija. Pušenje može suprimirati maturaciju DC, a kod animalnih modela sa emfizemom uočeno je smanjenje ili povećanje broja DC i smanjena maturacija [80-82]. Diferencijacija mijeloidnih DC je poremećena u malim disajnim putevima aktivnih pušača i pacijenta sa HOBP, što rezultira selektivnom akumulacijom LDC podtipa što korelira sa plućnom ekspresijom LDC indukujućeg faktora diferencijacije activating-A [83]. U studiji *Tsoumakidou Maria et al.* je dokazano da je broj DC malih disajnih puteva i alveolarnih DC koje ekspimiraju marker CD83, snižen kod pacijenata sa HOBP [84].

*Eozinofili.* Čini se da su pacijenti sa eozinofilijom u HOBP podgrupa kod koje postoji terapijski odgovor na lečenje kortikosteroidima [85,86]. Dodatno, neke, ali ne sve studije su ukazale da povećan broj eozinofila u perifenoj krvi kod pacijenta sa HOBP ima prediktivnu vrednost za veću učestalost egzacerbacija [87,88]. Takođe je uočeno da sistemska evaluacija eozinofilije u sputumu može pomoći u prevenciji egzacerbacija [89].

Kod pacijenata sa HOBP, inflamatorne promene nalik onima koje se odigravaju u plućima, se mogu uočiti i u sistemske cirkulaciji. Postoji nekoliko teorija o širenju inflamatornog procesa sa lokalnog na sistemski nivo, ali nijedna nije donela pouzdana zaključke o mehanizmu sistemske inflamacije u HOBP. Jedan od

potencijalnih mehanizama odnosi se na teoriju “prelivanja” inflamatornog odgovora iz pluća u sistemsku cirkulaciju, povećanje nivoa izvesnih cirkulišućih proinflamatornih citokina u vezi sa hroničnom hipoksijom [90]. U HOBP je primetan i porast reaktanata akutne faze, C-reaktivnog proteina i fibrinogena, u egzacerbaciji, ali i u stabilnoj fazi bolesti [91-93]. Inflamacija u plućima, ali i sistemska inflamacija koja se javlja kod obolelih dovodi se u vezu i sa pojavom komorbiditeta, pre svega kardiovaskularnih bolesti, gubitkom mišićne mase, ostoporozom i depresijom.

### **1.1.2. Funkcijske karakteristike pacijenata sa HOBP**

Bronhoopstrukcija je jedna od osnovnih karakteristika HOBP, a FEV<sub>1</sub> se koristi kao ključni marker za stepen bronhoopstrukcije i težine oboljenja. Bronhoopstrukcija postoji kada je odnos forsiranog ekspirijumskog volumena u prvoj sekundi i forsiranog vitalnog kapaciteta FEV<sub>1</sub>/FVC manji od 70% . Međutim, pojedine studije su utvrdile da se pacijenti sa približnim vrednostima izmerenog FEV<sub>1</sub>, značajno razlikuju po starosnom dobu, simptomima, komorbiditetima, broju egzacerbacija i predviđenom mortalitetu [94]. FEV<sub>1</sub> ne odražava heterogenost, koja je karakteristika obolelih od HOBP, a ograničenje protoka vazduha, mereno FEV<sub>1</sub>, nepotpuno koreliše sa težinom simptoma, kvalitetom života obolelih, kliničkim fenotipom HOBP, nekim vanplućnim manifestacijama i terapijskim modalitetima (fizikalna terapija) [95]. Usled opstrukcije disajnih puteva i smanjenja ekspirijumskog protoka, statička hiperinflacija pluća i porast tokom aktivnosti - dinamska hiperinflacija, dovode do gubitka elastičnih svojstva pluća, utiču na povećanje inspiratornog napora, smanjenje ventilatorne rezerve i potenciraju dispneju. Kod zdravih, tokom mirnog disanja pluća se vraćaju na bazalni nivo inflacije što odgovara volumenu na kraju ekspirijuma (engl. end-expiratory lung volume (EELV)) ili funkcionalnom rezidualnom kapacitetu- FRC (engl. functional residual capacity ). Kod pacijenta sa HOBP, EELV je povišen u miru i to stanje odgovara hiperinflaciji tj. povećanom volumenu vazduha u plućima nakon normalnog ekspirijuma [96]. Primarna determinišuća karakteristika hiperinflacije je povećanje TLC i konvencionalno se smatra da postoji kada je TLC preko 120% od

predviđenog. Hiperinflacija drugih kompartmenta (np. rezidualni volumen –RV ili EELV) je najčešće prisutna u sklopu povećanog TLC. Međutim neretko EELV i RV su povećani uprkos normalnom ili blago povišenom TLC, i smatra se da je u slučaju naročito značajnih povećanja volumena dinamski mehanizam dominantan [97]. Porast RV u HOBP može označavati i smanjeno trajanje forsiranog ekspiratornog manevra usled izražene respiratorne nelagode i dispneje [97]. Hiperinflacija pluća je prisutna ukoliko su merenja EELV, RV ili RV/TLC iznad gornjih granica prirodne varijacije, a u praksi vrednosti koje prelaze 120–130% od predviđenog su klinički potencijalno značajne, no ove “granične (engl. cut-off)” vrednosti ostaju arbitrarne [97]. Za sada ne postoji standardizovan sistem za stratifikaciju stepena i težine hiperinflacije. U odsustvu konsenzusa, kada se koristi termin težina hiperinflacije, potrebno je naznačiti kompartman na koji se odnosi (TLC, EELV, RV), metod korišćen u merenju, a vrednost izraziti kao % od predviđenog [98, 99]. Smatra se da u HOBP prirodni razvoj hiperinflacije nastaje tokom dužeg vremenskog perioda, čak dekadama, i da najpre dolazi do porasta rezidualnog volumena (RV), potom end-ekspiratornog plućnog volumena (EELV) usled narušenih statičkih mehaničkih svojstava i konačno totalnog plućnog kapaciteta (TLC) uporedo kako raste i komplijansa pluća [100]. Ipak, ima se utisak da vremenski period promena u različitim kompartmanima i nastanku hiperinflacije, varira među pacijentima, te se može razmišljati o eventualnom uticaju učestalosti i težine egzacerbacija.

Snižen IC u miru može biti indikator prisustva hiperinflacije kod pacijenata sa ekspiratornom limitacijom protoka (engl. expiratory flow limitation –EFL) [101]. Veoma snižen odnos inspiratornog kapaciteta i totalnog plućnog kapaciteta (IC/TLC) sa vrednošću od 25% je prediktor mortaliteta kod pacijenta sa HOBP [102].

### **Uloga sistema proteaza/antiproteaza u HOBP**

Matrix metalloproteinaze (MMPs), ili matriksini, čine familju endopeptidaza zavisnih od cinka (Zn) i kalcijuma (Ca), koje učestvuju u razlaganju ekstracelularnog matriksa (ECM). ECM je kompleksna smeša strukturnih i

signalnih molekula koja obezbeđuje dinamsku potporu ćelijama i tkivima i pohranjuje ugrađene informacije koje moduliraju ponašanje ćelija [103]. MMP razgrađuju različite strukturne proteine ECM kao što je kolagen intersticijalne i bazalne membrane, proteoglikan, fibronektin i laminin. Pravovremena degradacija ECM je važno svojstvo mnogih fizioloških procesa u organizmu, precizno je regulisana pod normalnim, fiziološkim uslovima, ali usled disregulacije, postaje uzrok mnogih oboljenja. MMP imaju važnu ulogu u mnogim normalnim fiziološkim procesima kao što je embrionalni razvoj, reprodukcija, remodelovanje tkiva, zarastanje rana, a takođe učestvuju u različitim inflamatornim stanjima, autoimunim oboljenjima, malignitetima, neurološkim, plućnim i kardiovaskularnim bolestima [104]. Danas znamo da MMP mogu regulisati ćelijsku proliferaciju i migraciju, progamiranu ćelijsku smrt, angiogenezu, imunski odgovor i inflamaciju, rast tumora i nekoliko drugih procesa. Na osnovu organizacije domena i preferencije ka supstratu, MMP se grupišu u kolagenaze (MMP-1/-8/-13), želatinaze (MMP-2 i MMP-9), stromelizine (MMP-3 , MMP -10; ), matrilizine (MMP-7 and -26), membrane-type (MT)-MMP i druge [105]. Iako se količine novosintetisane MMP regulišu uglavnom na nivou transkripcije, proteolitička aktivnost postojećih MMP se kontroliše kroz aktivaciju proenzima ili zimogena i inhibicijom aktivnih enzima endogenim inhibitorima kao što su :  $\alpha$ 2-Makroglobulin i tkivni inhibitori metaloproteinaza (TIMP) [105]. TIMP formiraju 1:1 nekovalentne komplekse sa MMP i blokiraju pristup suspstratu na katalitičkim mestima. TIMP su visoko specifične za MMP globalno, ne za pojedinačne MMP, a funkcionalna specifičnost se vezuje za druge karakterstike. Ovi protein funkcionišu kao značajni regulatori aktivnosti MMP, a u nekim slučajevima i drugih metaloendopeptidaza ADAM, ADAMTS (engl. disintegrin metalloproteinases with thrombospondin motifs). Sva četiri TIMP inhibiraju MMP ,ali sa variranjem za različite inhibitor-proteaza parove. Najširi spektar inhibicije ima TIMP 3, koja inhibira i nekoliko ADAM i ADAMTS porodice [106]. Uz aktivnost kao inhibitori MMP , TIMP imaju i različite biološke aktivnosti u smislu podsticanja ćelijske proliferacije, anti-angiogenetsko, pro i anti-apoptotično, aktivnost na sinapsama, koje su neovisne od inhibicije MMP. [107].



U grupu želatinaza spadaju (MMP-2 and MMP-9) koje razgrađuju želatin uz pomoć svoj tri nastavka za fibronectin tip II koji se vezuju sa želatin /kolagen. Oni takođe razgrađuju brojne molecule ECM kao što su: tip IV, V i XI kolagena, laminin, agrekan. [108]. MMP 9 u plućima sekretuju neutrofili, alveolarni makrofagi, epitelne ćelije, eozinofili i mastociti [109]. Jedna od hipoteza o nastanku emfizema je hipoteza proteaza–antiproteaza koja se bazira na pretpostavci da hronična ekspozicija duvanskom dimu prouzrokuje infiltraciju disajnih puteva inflamatornim ćelijama koje potom oslobađaju proteaze i konačno proteaze razgrađuju ECM i vode u emfizem [110]. Poznata je uloga neutrofilne elastaze (NE) u patogenezi emfizema, koju dodatno pojačava pušenje i deficit alfa 1 antitripsina kao glavnog inhibitora NE [111]. Ipak, tokom godina istraživanja pušenjem-izazvanog emfizema, postalo je jasno da samo razgradnja elastina ne može objasniti nastanak karakterističnih morfoloških promena. Matriks metaloproteinaza 9 (MMP-9), poznata i kao želatinaza B ili neutrofilna kolagenaza je prisutna u želatinoznim granuloma neutrofila, i zajedno sa drugim MMP, učestvuje u razlaganju glavnih strukturalnih komponenta ekstracelularnog matriksa kao što su: kolagen, laminin i želatin. Neutrofilija disajnih puteva i MMP 9 su u porastu sa godinama, pušenjem i HOBP [112]. *Russell et al.* je ukazao da alveolarni makrofagi pacijenata sa HOBP oslobađaju veće količine MMP-9 sa većom enzimskom aktivnošću nego oni kod zdravih pušača [113]. Takođe alveolarni makrofagi pacijenta sa HOBP usled održavanja aktivnosti, mogu proizvesti povećanje izvesnih matriksmetaloproteinaza (MMP 9, MMP 12) [41]. MMP 9 je povećana u indukovanom sputumu pušača koji nemaju respiratorne simptome [114], ali i u sputumu pacijenata sa HOBP i astmom [115]. U studiji *Beeh K.M. et al.* visoke vrednosti MMP9 i TIMP-1 su uočene u sekretu disajnih puteva kod pacijenata sa HOBP, a koncentracije MMP-9 su negativno korelirale sa bronhoopstrukcijom (FEV<sub>1</sub>%FVC) ali ne i sa difuzijskim kapacitetom i vitalnim kapacitetom, dok su pozitivno korelirale sa neutrofilijom u sputumu [116]. Jos jedna studija *Culpitt SV et al.* je ukazala da su nivoi MMP 9 u sputumu pacijenta sa emfizemom povišeni, i u negativnoj korelaciji sa FEV<sub>1</sub> [117]. MMP 9 imaju i prirodne inhibitore, četiri tipa jedinjenja označena kao tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (TIMP), a alveolarni makrofagi sekretuju TIMP 1 i TIMP 2. Polimorfonuklearne ćelije

pacijenata sa HOBP sintetišu manje TIMP u odnosu na zdrave pušače i nepušače [118]. Koncentracija TIMP-1 bila je značajno veća kod pacijenta u stabilnoj HOBP u odnosu na pacijente iz kontrole i sa astmom, i u negativnoj korelaciji sa FEV1 i FEV1/FVC kod pacijenata sa HOBP [119]. U egzacerbaciji HOBP postoji disbalans MMP 9 i njenog inhibitora TIMP1 [120], ali i disbalans oksidanasa/antioksidanasa [121]. Genetski polimorfizam promoter gena za MMP 9 je udružen sa sklonošću ka COPD [122], a ukazano je na interakciju između gena i sredinskih faktora kao mogućeg uzroka ozlede pluća u emfizemu [123]. Imunohistohemijskom analizom pluća pacijenata sa HOBP uočena je pojačana ekspersija kolagenaze 1 i 2 i želatinaze A i B, a neutrofili su pokazali pozitivan signal za kolagenazu 2 i želatinazu B [124]. Takođe MMP 9 kod pušača je slično kao i kod duvanu izloženih miševa, prisutna u emfizemskom pluću, ali ne i u korelaciji sa emfizemom [125].

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Ispitati nivoe pokazatelja sistemske inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza u grupi pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća.
2. Ispitati povezanost pokazatelja sistemske inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza sa pokazateljima plućne funkcije.
3. Ispitati povezanost pokazatelja sistemske inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza sa kliničkim karakteristikama pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća (GOLD stadijum, obim simptoma, broj i učestlost egzacerbacija) .

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

#### **3.1. Ispitanici i dizajn**

Ova studija preseka je sprovedena kako bi se utvrdilo postojanje disbalansa u sistemu proteaza/antiproteaza kod pacijenta sa HOBP i moguća poveznost sa kliničkim i funkcijskim pokazateljima. Studija je sprovedena u skladu sa Načelima dobre kliničke prakse (GCP) i u skladu sa Helsinškom deklaracijom. Za izvođenje studije obezbeđene su sve neophodne dozvole i saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu i Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Sve osobe od kojih je uziman biološki material koji je kasnije korišćen u istraživanju, potpisale su pristanak za dobrovoljno učešće u studiji i obaveštene su o ciljevima i očekivanim ishodima studije. Ovim istraživanjem su bili obuhvaćeni svi pacijenati sa dijagnozom hronične opstruktivne bolesti pluća, koji su lečeni u periodu od maja 2017.godine do januara 2018.godine na Odeljenje za astmu, HOBP i hroničnu respiracijsku insuficijenciju Klinike za pulmologiju KCS, i koji su ispunjavali kriterijume za uključanje u istraživanje, ukupno 98 ispitanika. Ispitanici su bili stariji od 40 godina, pušači i bivši pušači, skoro podjednake zastupljenosti oba pola. Kriterijumi za uključanje u istraživanje su bili postavljena dijagnoza hronične opstruktivne bolesti pluća, stabilno stanje bolesti, potpisan informisani pristanak pacijenta. Dijagnoza HOBP je postavljena u skladu sa kriterijumima Globalne inicijative za Hroničnu opstruktivnu bolest pluća (engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Disease - GOLD) [1], uz kliničku korelaciju, i ne kraće od 6 meseci od početka istraživanja. Stabilno stanje je definisano kao stanje bez pogoršanja respiratorne funkcije u trajanju od najmanje 4 nedelje, a koje ne zahteva promenu terapije, primenu sistemskih steroida i/ili antibiotika. Kriterijumi za isključenje iz studije su bili: druga ili pridružena aktivna plućna bolest koja nije HOBP, imunosupresija (HIV, hronična steroidna terapija, transplantiran organ), nesaglasnost pacijenta za učestvovanje u studiji ili neadekvatna saradnja. Demografski podaci, pušački status, vreme postavljanja dijagnoze HOBP, aktuelne respiratorne tegobe, broj egzacerbacija tokom prethodne godine, mesto i način njihovog zbrinjavanja, podaci o komorbiditetima (kardiovaskularne bolesti -srčana insuficijencija, ishemijska bolest srca, aritmije,

arterijska hipertenzija, periferna okluzivna bolest krvnih sudova, osteoporoza, depresija, dijabetes, gastroezofagealna refluksna bolest (GERB)) i konkomitantnoj terapiji, kao i podaci o aktuelnoj terapiji za HOBP, su dobijeni popunjavanjem upitnika od strane istraživača, putem usmenog intervju sa ispitanikom ili iz dostupne medicinske dokumentacije. Ispitanici su podeljeni u grupe, na osnovu GOLD stadijuma. GOLD stadijumi su formirani na osnovu stepena bronhopstrukcije koja se bazira na vrednostima post-bronhodilatacijskog FEV1 kod pacijenata sa post-bronhodilatacijskim odnosom  $FEV1/FVC < 0,70$ . Definisana su 4 GOLD stadijuma: blaga /GOLD 1 ( $FEV1 \geq 80\%$ ), umerena/GOLD 2 ( $FEV1 50-79\%$ ), teška/GOLD 3 ( $FEV1 30-49\%$ ), i veoma teška/GOLD 4 ( $FEV1 < 30\%$ ) HOBP [1]. Intenzitet dispneje je procenjen petostepenom skalom MMRC skalom dispneje (engl. Modified Medical Research Council (mMRC)). Zdravstveno stanje, težina i obim simptoma je procenjen upitnikom za procenu HOBP (engl. COPD Assessment Test - CAT), prevedenom na srpski jezik i validiranom [126]. Ispitanici su u daljem toku podeljeni na osnovu CAT zbira u dve grupe, grupa 1 ( $CAT < 10$ , ispitanici sa manje simptoma), grupa 2 ( $CAT \geq 10$ , ispitanici sa više simptoma) [1]. CAT se zasniva na ukupno 8 pitanja o kašlju, sekretu u grudima, stezanju u grudima, hodu uz brdo, obavljanju kućnih poslova, sigurnosti izlaska iz kuće, kvalitetu spavanja i osećaju snage. Ovaj upitnik bolesnici sami popunjavaju. Nulom se označava izostanak tegobe, a sa 5 njena maksimalna ispoljenost, tako da je raspon mogućih poena od 0-40. Kod ispitanika je utvrđena i kategorija rizika za egzacerbaciju bolesti je procenjena na osnovu GOLD smernica, na A (mali rizik, manje opterećenje simptomima), B (mali rizik, veće opterećenje simptomima), C (veliki rizik, malo opterećenje simptomima) i D (veliki rizik, veliko opterećenje simptomima) [1]. Pacijenti su takođe podeljeni na osnovu broja egzacerbacija uz izdvajanje fenotipa egzerceratora. "Egzercerator" je pacijent sa HOBP koji ima  $\geq 2$  egzacerbacije godišnje [14]. Emfizem –hiperinflacija fenotip definiše pacijente sa HOBP kod kojih su dispneja i intolerancija napora dominantni simptomi i najčešće ih prate znaci hiperinflacije [14]. Kontrolnu grupu čini 47 zdravih osoba, uparenih po godinama i polu sa pacijentima, regrutovanih tokom redovnog laboratorijskog sistematskog godišnjeg pregleda. Isključni kriterijumi za kontrolnu grupu su bile sve sistemske bolesti, uključujući plućne i kardiovaskularne bolesti, osteoporozu,

aktivna infekcija, aktivni maligniteta ili neurološke bolesti. Uzorkovanje krvi je sprovedeno u jutarnjim časovima iz prednje kubitalne vene vakutajner sistemima sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom (EDTA) za analizu parametara kompletne krvne slike i diferencijalne leukocitarne formule i za izdvajanje plazme i vakutajnerima sa serum gel separatorom za dobijanje seruma. Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom je određivana neposredno nakon uzorkovanja u skladu sa standardnom procedurom. Uzorci su centrifugirani nakon 30 minuta na sobnoj temperaturi 1000 x g petnaest (15) minuta. Serumi su odvajani u alikvote, a potom čuvani na -80° C do trenutka analiziranja.

### **3.2. Pokazatelji plućne funkcije**

Pokazatelji plućne funkcije su mereni ispitivanjem spirometrije, difuzijskog kapaciteta za ugljen-monoksid (CO) i telesne pletizmografije u skladu sa smernicama Američkog Torakalnog Društva i Evropskog Respiratornog Društva (engl. American Thoracic Society/European Respiratory Society ATS/ERS) [127,128]. Merene su postbronhodilatatorne vrednosti 30 minuta nakon inhalacije kratkododeljujućeg bronhodilatatora. Mereni su : forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1), forsirani vitalni kapacitet (FVC) i odnos FEV1/FVC uz mere protoka u malim disajnim putevima, spirometrijski (Master Screen Spiro.). Totalni plućni kapacitet (TLC), ukupni toraksni gasni volumen (ITGV), rezidualni volumen (RV), vitalni kapacitet (VC),ekspiratorni rezervni volume (ERV), inspiratorni kapacitet (IC), procentualni odnos RV%TL, ukupni otpor (Raw tot ) na telesnom pletizmografu (MasterScreen Body), difuzijski kapacitet pluća (DLCO) i koeficijent difuzije (KCO) na aparatu za merenje transfer faktora pluća za ugljen monoksid (Master Screen Diff) [129-131]. Saturacija krvi kiseonikom( SAT %) je merena pulsним oksimetrom u skladu sa aktuelnim standardima. U skladu sa standardima pacijentima je prethodno učinjeno antropometrijsko ispitivanje telesne težine (TT) u kg, telesne visine (TV) u m, i indeks telesne mase (engl. Body Mass Index-BMI) po formuli  $BMI = TT (kg)/TV (m)^2$ .

### **3.3. Pokazatelji inflamacije i kompletna krvna slika**

Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom je određivana neposredno nakon uzorkovanja u skladu sa standardnom procedurom. Analiza krvne slike s diferencijalnom formulom izvršena je na hematološkom analizatoru LH750® proizvođača Beckman Coulter (Beckman Coulter, Inc, Brea, California, USA). Hematološki analizatori proizvođača Beckman Coulter zasnovani su na Coulter-ovom principu brojanja i VCS tehnologiji. Coulter-ovim principom, odnosno metodom impedance, omogućeno je brojanje ćelija, te određivanje njihovog volumena. VCS tehnologija (eng. V-volume, C-conductivity, S-scatter) obuhvata merenje volumena subpopulacija leukocita metodom impedance, određivanje unutrašnje strukture merenjem provodljivosti kao i merenje granularnosti citoplazme i strukture jedra pomoću rasipanja laserskog zraka, pri čemu se generišu podaci na uzorku od oko 8000 ćelija.

Koncentracija hsCRP u serumu je merena pomoću imunoturbidimetrijske metode, komercijalnim testom, na biohemijском analizatoru AU2700® proizvođača Beckman Coulter (Beckman Coulter, Inc, Brea, California, USA).

### **3.4. Pokazatelji sistema proteaza/antiproteaza**

Koncentracija matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9), tkivnog inhibitora metaloproteinaza -1 (TIMP1) određivana je komercijalnim ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) testovima (Quantikine<sup>r</sup> ELISA Research and Diagnostic System, Minneapolis, MN, USA). Analiza uzoraka je učinjena na Odeljenju za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu pacijentima i kontrolnoj grupi. Princip metode se zasniva na tome da su zidovi bunarčića eliza ploče obloženi primarnim antitelma (At) za odgovarajući protein (Ag). Dodatkom razblaženog uzorka u kome se nalaze antigen (Ag: MMP-9, TIMP1) dolazi do imunohemijske reakcije Ag-At. Višak uzoka se ispira, a zatim dodaju sekundarna At obeležena peroksidazom. Supstrat za bojevu reakciju je rastvor tetrametil-benzidina (TMB) i vodonik-peroksida. Reakcija se zaustavlja dodatkom 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Apsorbanca dobijenog jedinjenja meri se na 450 nm.

Koncentracije Ag se očitavaju iz standardnih kriva koje se dobijaju iz seije rastvora poznatih koncentracija.

### **3.5. Statistička analiza**

Za analizu primarnih podataka korišćene su deskriptivne statističke metode, metode za testiranje statističkih hipoteza i metode za ispitivanje povezanosti. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana, mod), mere varijabiliteta (standardna devijacija, interkvartilni opseg) i relativni brojevi (pokazatelji strukture). Normalnost raspodele podataka je testirana grafičkim i matematičkim metodama. Od metoda za testiranje statističkih hipoteza korišćen je t-test, Mann Whitney test, hi-kvadrat test, Fisherov test u zavisnosti od tipa i raspodele podataka. Od metoda za analizu povezanosti korišćeni su Pirsonov ili Spirmanov koeficijent korelacije, u zavisnosti od tipa i raspodele podataka. Za određivanje cut off vrednosti za kontinuirane varijable korišćena je ROC kriva (receiver operating curve). Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0.05.



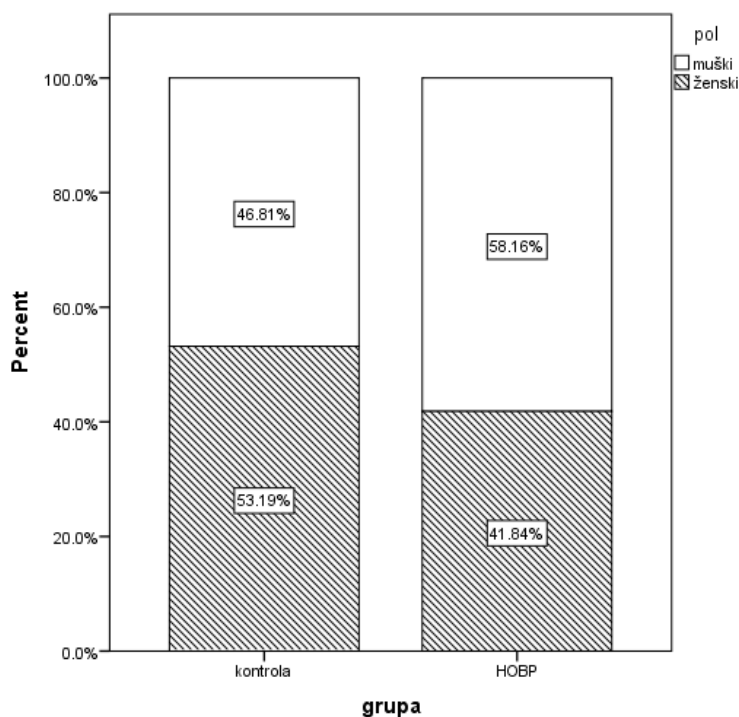
## 4. REZULTATI

### 4.1. Deskriptivni pokazatelji

#### 4.1.1. Osnovni demografski i klinički podaci

U istraživanje je bilo uključeno 98 pacijenata sa HOBP prosečne starosti  $63.4 \pm 4.3$  i 47 pacijenata u kontrolnoj grupi prosečne starosti  $61.7 \pm 4.3$ . Nije bilo statistički značajne razlike u starosti ispitanika između grupa ( $p=0.123$ ). Distribucija pacijenata prema polu je bila slična ( $p=0.199$ ) grafik 1.

Grafik 1. Distribucija pacijenata prema polu



Osnovne demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa HOBP prikazane u tabeli 1. Oko 1/3 pacijenata su bili pušači, a 2/3 bivši pušači. U terapiji 94,9% pacijenata je imalo LAMA, bilo kao monoterapiju ili u kombinaciji sa ICS/LABA, 18,4% je imalo LABA, a 67,3% je imalo ICS/LABA u kombinaciji sa LAMA, obzirom da nijedan pacijent nije imao fiksnu kombinaciju bez LAMA.

Oksigenoterapiju je imalo 6,1% pacijenata, a Roflumilast 2%. Oralni Teofilin je koristilo 10% pacijenata.

Tabela 1. Pušački status i terapija pacijenata sa HOBP

	N (%)
Bivši pušač	63 (64.3)
Pušač	35 (35.7)
LAMA ukupno	93 (94.9)
LAMA mono	27 (26,2)
LABA	18 (18.4)
ICS/LABA +LAMA	66 (67.3)
SABA	96 (98)
OKSIGNOTRP.	6 (6.1)
ROFLUMILAST	2 (2)
TEOFILIN	10 (10.2)
ICS	0 (0)

Deskripcija kliničkih karakteristika bolesnika je prikazana u tabeli 2. Bolesnici su prosečno 7 g imali HOBP, prosek paklo/godina je bio 30, a broj egzacerbacija 2.

Tabela 2. Kliničke karakteristike bolesnika

	Medijana (interkvartilni opseg)
PAKLO/GOD	30 (15)
BR.EGZACERB.	2 (2)
TRAJANJE HOBP	7 (6)

Učestalost komorbidetita je prikazana u tabeli 3. Oko 2/3 bolesnika je imao komorbiditete. Najčešći komorbiditeti su bili kardiovaskularne etiologije 50% subjekata je imalo kardiovaskularni komorbiditet. Najučestaliji KVS komorbiditet

je bio arterijska hipertenzija, potom ishemijska bolest, aritmije i srčana insuficijencija.

Tabela 3. Učestalost komorbiditeta

		N (%)
komorbiditeti	ne	34 (34.7)
	da	64 (65.3)
KVS	ne	49 (50)
	da	49 (50)
SRČANA INSF.	ne	93 (94.9)
	da	5 (5.1)
ISH. BOLEST	ne	82 (83.7)
	da	16 (16.3)
ARITMIJA	ne	87 (88.8)
	da	11 (11.2)
PVD	ne	0 (0)
	da	0 (0)
HTA	ne	49 (50)
	da	49 (50)
OSTEOPRZ	ne	96 (98)
	da	2 (2)
DEPRES	ne	95 (96.9)
	da	3 (3.1)
MSIDM	ne	86 (87.8)
	da	12 (12.2)
GERB	ne	96 (98)
	da	2 (2)
OSAS	ne	97 (99)
	da	1 (1)

#### 4.1.2. Ispitivanje plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza

U tabeli 4 su prikazane post-bronhodilatacijske vrednosti merenja pokazatelja plućne funkcije. Ispitanici su imali srednju vrednost izmerenog post-BD FEV1/FVC (%)  $43.7 \pm 12.6$ , a post-BD FEV1 (%)  $47 \pm 18.6$ , što ukazuje na tešku do umerenu bronhoopstrukciju, uz normalnu do blago sniženu srednju vrednost izmerenog FVC (%)  $85.6 \pm 19.4$  i značajno smanjene srednje vrednosti protoka u malim disajnim putevima. Ispitanici su imali srednju vrednost izmerenog difuzijskog kapaciteta DLCO (%)  $50.1 \pm 21.8$ , što ukazuje na umereno do blago oštećenje difuzije sa min. izmerenom vrednosti od 15% do max.izmerene vrednosti od 109%. Vrednosti TLC ( $125.5 \pm 23.5$ ) su povišene, kao i RV % ( $194.6 \pm 63.4$ ) RV%TLC ( $146.4 \pm 28.1$ ) i ukazuju na hiperinflaciju. Srednja vrednosti izmerenog otpora u disajnim putevima R tot  $0.6 \pm 0.3$  je dvostruko povećana u odnosu na LL

Tabela 4. Deskripcija parametara plućne funkcije

	Aritmetička sredina $\pm$ sd
FEV1/FVC	$43.7 \pm 12.6$
FVC %	$85.6 \pm 19.4$
FVC (L)	$2.9 \pm 0.9$
FEV1 %	$47 \pm 18.6$
FEV1 (L)	$1.3 \pm 0.6$
PEF	$54.1 \pm 21.2$
MEF50	12.0 (12.0)
MEF25	15.0 (11.0)
SAT %	$94 \pm 3.4$
SF (otk/min)	$81.8 \pm 12$
DLCO%	$50.1 \pm 21.8$
KCO%	$60.8 \pm 24.1$
TLC%	$125.5 \pm 23.5$
TLC (L)	$7.3 \pm 1.6$
ITGV %	$166.7 \pm 44.7$
ITGV(L)	$5.2 \pm 1.5$

RV%	194.6 ± 63.4
RV (L)	4.2 ± 1.3
VC %	91.3 ± 19.5
VC (L)	3.1 ± 1
ERV%	112.0 (66.0)
ERV (L)	1 ± 0.6
RV% TLC	146.4 ± 28.1
Rtot	0.6 ± 0.3
Rtot %	187.8 ± 96.2
IC %	85.1 ± 30
IC (L)	2.1±0.7

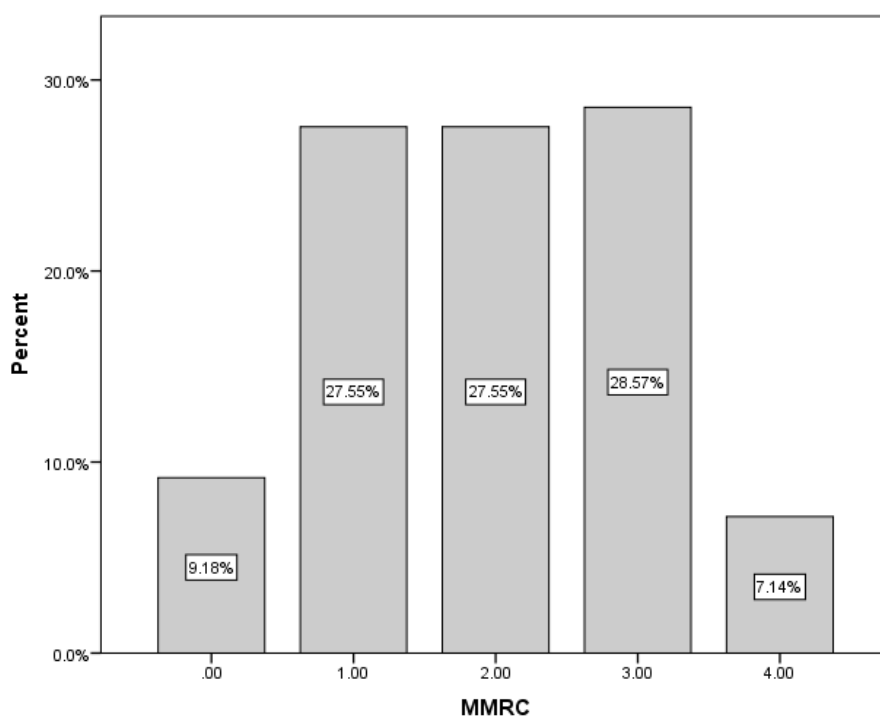
¥ medijana (interkvartilni opseg)

Intenzitet dispneje je procenjen petostepenom skalom MMRC skalom dispneje (engl. Modified Medical Research Council (MMRC), a obim simptoma je procenjena upitnikom za procenu HOBP (CAT), rezultati su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. MMRC i CAT upitnik

	Medijana (interkvartilni opseg)
CAT	18.5 (14.2)
MMRC	2.0 (2.0)

Grafik 2. mMRC prema kategorijama



Kod ispitanika je utvrđena i kategorija rizika za egzacerbaciju bolesti je procenjena na osnovu GOLD smernica, na A( mali rizik, manje opterećenje simptomima), B (mali rizik, veće opterećenje simptomima), C (veliki rizik, malo opterećenje simptomima) i D (veliki rizik, veliko opterećenje simptomima), tabela 6. Najveći broj pacijenata je bio u D kategoriji, a najmanji u C kategoriji.

Tabela 6 . Kategorija rizika za egzacerbaciju bolesti

		N (%)
Kategorija rizika za egzacerbaciju bolesti	A	14 (14.3)
	B	26 (26.5)
	C	9 (9.2)
	D	49 (50)

Grafik 3. Kategorija rizika za egzacerbaciju bolesti

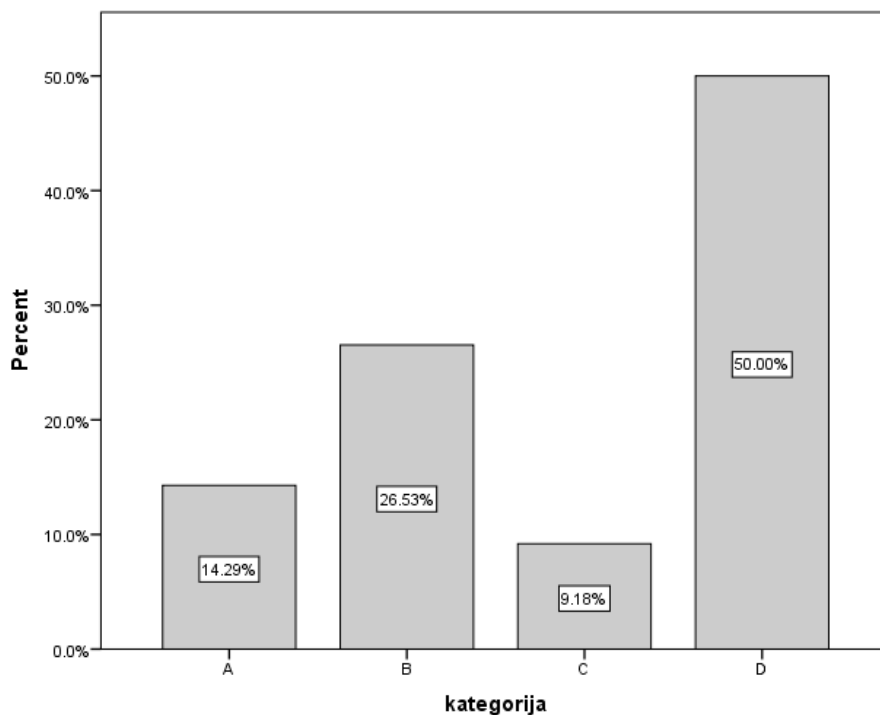


Tabela 6a. Starost i broj egzacerbacija prema ABCD kategoriji

	A	B	C	D	p
godine	60.2 ± 12.0	65.1 ± 10.9	67.0 ± 6.0	63.8 ± 8.0	0.451
Broj egzacerbacija	0 (1.0)	1.0 (1.0)	2.0 (3.0)	3.0 (1.0)	<0.001

Nije bilo statistički značajne razlike u starosti između pacijenata u različitim kategorijama. Broj egzacerbacija se statistički značajno razlikovao između kategorija, sa najmanjim brojem u kategoriji A a najvećim brojem egzacerbacija u D kategoriji.

Tabela 6 b Starost prema GOLD stadijumu

	Gold 1 i 2	Gold 3 i 4	p
godine	64.9 ± 9.3	63.3 ± 9.3	0.443

Nije bilo statistički značajne razlike u starosti između pacijenata sa GOLD stadijumom 1 i 2 u poređenju sa pacijentima sa stadijumom 3 i 4.

Tabela 6c. Egzacerbacije prema GOLD

	Broj egzacerbacija	
	r	p
GOLD	0.363	<0.001
FEV 1	-0.350	<0.001

Broj egzacerbacija je pozitivno, statistički značajno bio povezan sa GOLD, viši GOLD stadijum je bio udružen sa većim brojem egzacerbacija. Broj egzacerbacija je negativno, statistički značajno bio povezan sa FEV 1, sa padom FEV1 rastao je broj egzacerbacija.

#### 4.1.3. Pokazatelji inflamacije kod pacijenata sa HOBP

Deskripcija inflamatornih faktora je prikazana u tabeli 7. Prosečne vrednosti leukocita (Le) kao i parametara leukocitarne formule su bili u granicama normalnog referentnog opsega.

Tabela 7. Deskripcija inflamatorni faktori

	Aritmetička sredina ± sd
leukociti	8.4 ± 2.6
neutrofili %	62.4 ± 11.9
limfociti %	26 ± 8.9
eozinofili %	2.3 ± 1.7
neutrofili l	5.4 ± 2.3
limfociti l	2.1 ± 0.8
eozinofili l	0.2 ± 0.2
CRP	3.4 (6.2)



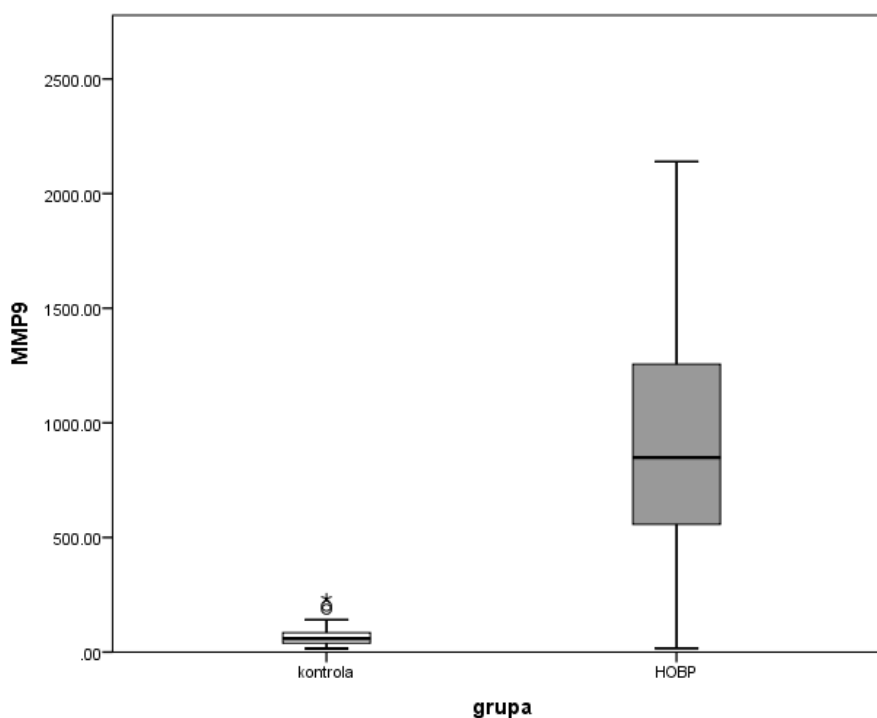
#### 4.1.4. Pokazatelji sistema proteaza/antiproteaza kod pacijenta sa HOBP i u kontrolnoj grupi

Ispitivani su pokazatelji sistema proteaza/antiproteaza kod pacijenta sa HOBP i u kontrolnoj grupi, rezultati su prikazani u tabeli 8. Vrednosti MMP-9, TIMP-1 kao i odnosa MMP-9/TIMP-1 su bile statistički značajno više u grupi pacijenata sa HOBP u poređenju sa zdravom kontrolom, grafici 4-6.

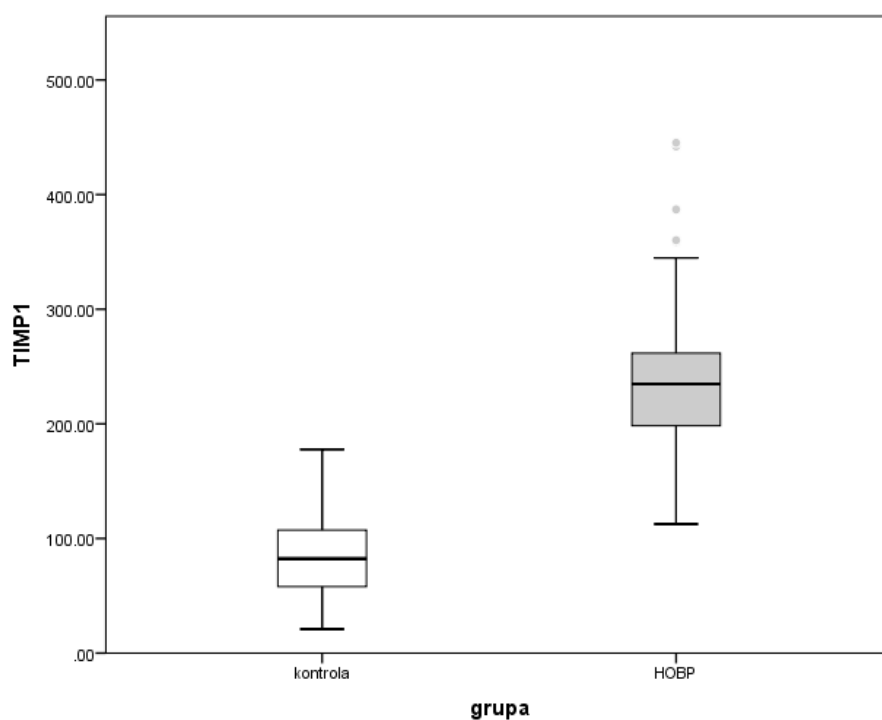
Tabela 8. Poređenje pokazatelja sistema proteaza/antiproteaza

	HOBP	Kontrolna grupa
MMP-9	848.7 (718.3)	58.7 (47.6)
TIMP-1	234.7 (63.4)	82.3 (63.4)
MMP-9/TIMP1	3.4 (3.1)	0.40 (0.25)

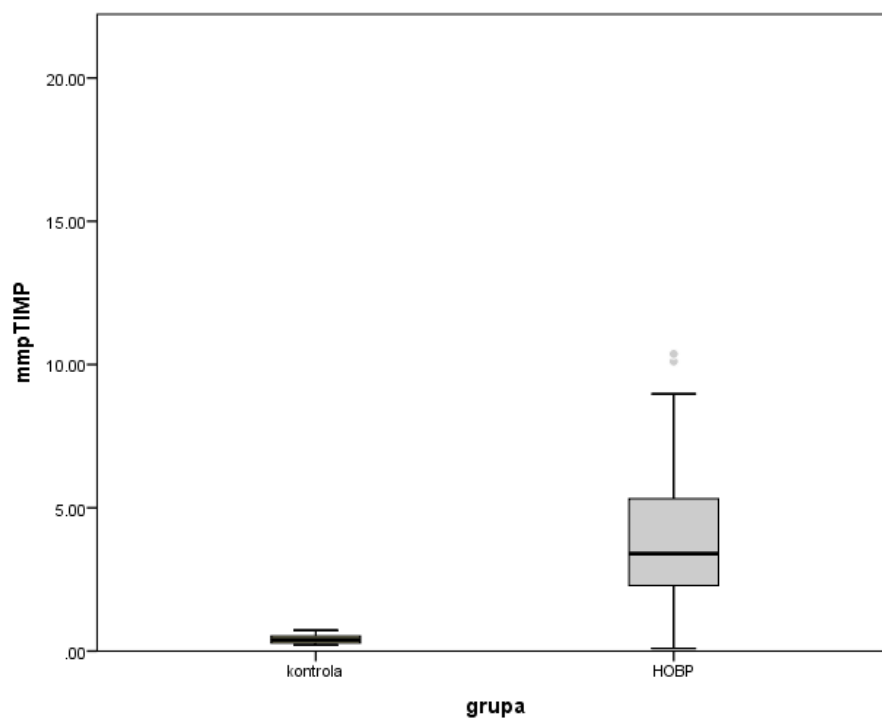
Grafik 4. MMP-9 kod bolesnika sa HOBP i kontrole



Grafik 5. TIMP-1 kod bolesnika sa HOBP i kontrole



Grafik 6. MMP-9/TIMP-1 kod bolesnika sa HOBP i kontrole



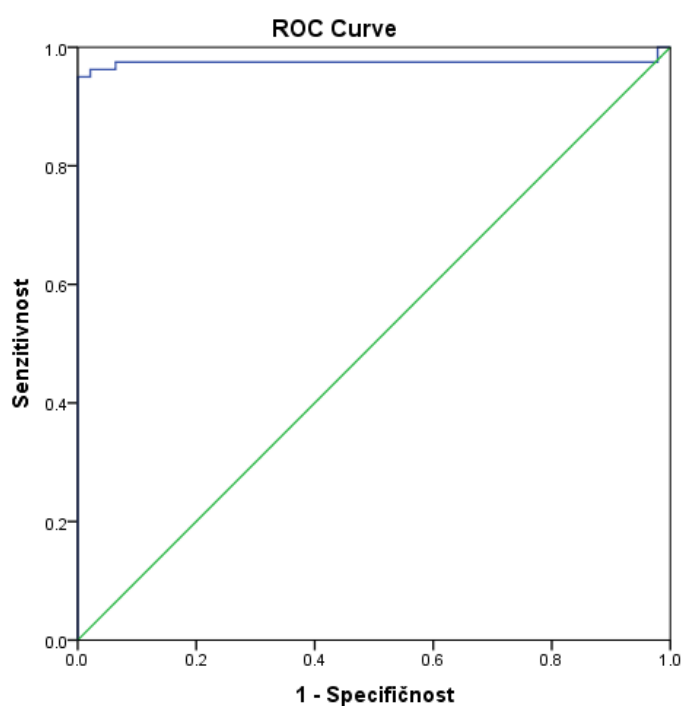
Ispitivane su senzitivnost i specifičnost MMP9 u dijagnozi HOBP, rezultati su prikazani u tabeli 9, grafik 7.

Tabela 9. Površina ispod krive za MMP-9

Površina ispod krive	p	95 %CI	
		Donja granica	Gornja granica
0.974	<0.001	0.941	1.000

Vrednost MMP-9 jednaka ili viša od 612.8 je bila senzitivna 70.0 % a specifična 100 % za postavljanje dijagnoze HOBP.

Grafik 7. Površina ispod krive za MMP-9 postavljanje dijagnoze HOBP



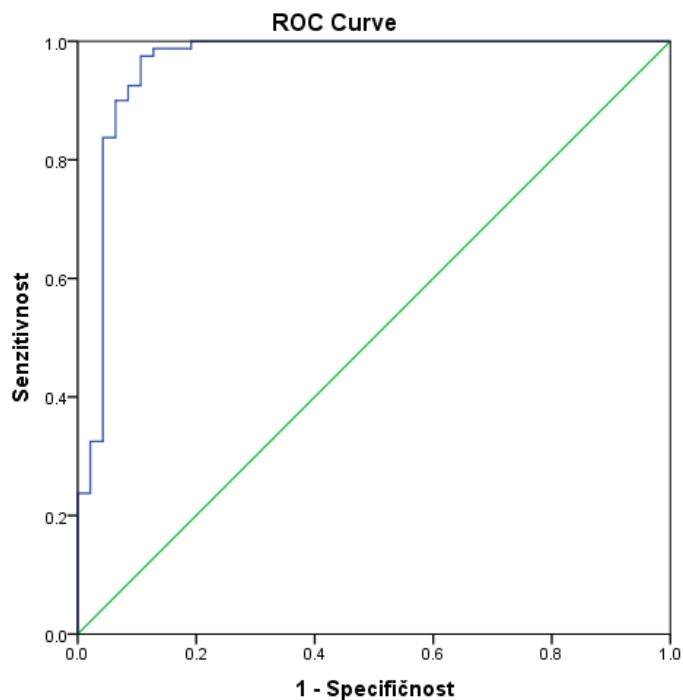
Ispitivane su senzitivnost i specifičnost TIMP-1 u dijagnozi HOBP, rezultati su prikazani u tabeli 10, grafik 8.

Tabela 10. Površina ispod krive za TIMP-1

Površina ispod krive	p	95 %CI	
		Donja granica	Gornja granica
0.961	0.022	0.918	1.000

Vrednost TIMP-1 jednaka ili viša od 110.7 je bila senzitivna 100 % a specifična 81 % za postavljanje .dijagnoze HOBP.

Grafik 8. Površina ispod krive za TIMP-1 postavljanje dijagnoze HOBP



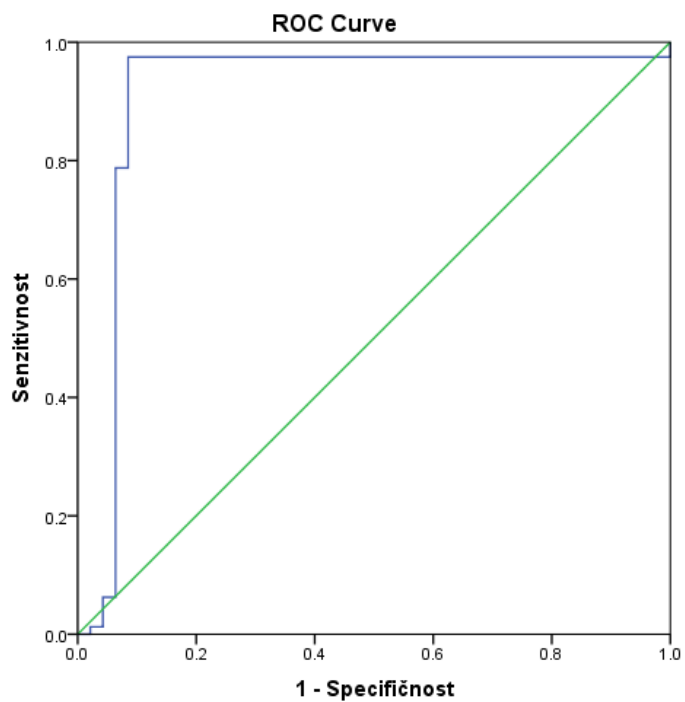
Ispitivane su senzitivnost i specifičnost MMP-9/TIMP-1 u dijagnozi HOBP, rezultati su prikazani u tabeli 11, grafik 9.

Tabela 11. Površina ispod krive za MMP-9/TIMP-1

Površina ispod krive	p	95 %CI	
		Donja granica	Gornja granica
0.910	<0.001	0.836	0.984

Vrednost MMP-9/TIMP-1 jednaka ili viša od 1.16 je bila senzitivna 96 % a specifična 91 % za postavljanje dijagnoze HOBP.

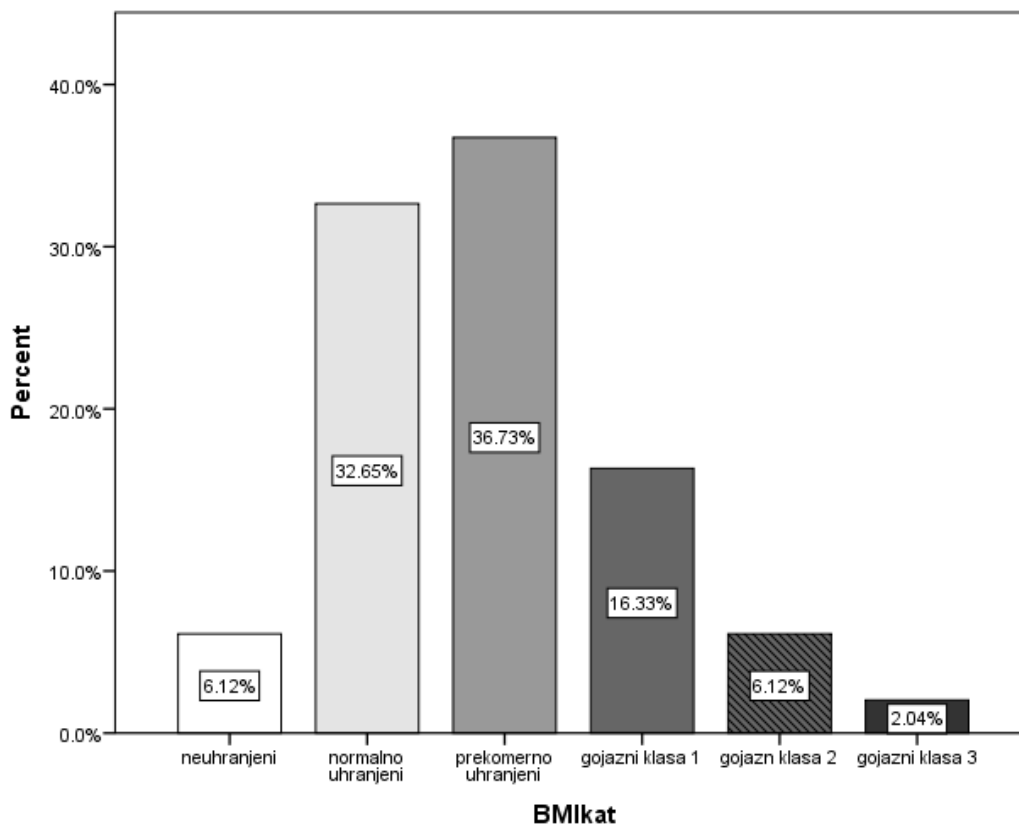
Grafik 9. Površina ispod krive za MMP-9/TIMP-1 postavljanje dijagnoze HOBP



#### 4.1.5. Antropometrijski pokazatelji

Prosečna vrednost BMI u grupi pacijenata sa HOBP je bila  $26.6 \pm 5.4$  kg/m<sup>2</sup>. Raspodela bolesnika prema kategorijama BMI je prikazana na grafiku 10.

Grafik 10. Raspodela bolesnika prema BMI kategorijama



#### 4.2. Korelacije pokazatelja funkcijskih, kliničkih, inflamacijskih i pokazatelja sistema proteaza/antiproteaza

##### 4.2.1. Korelacija između pokazatelja plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza

Korelacije između sistema proteaza/antiproteaza i pokazatelja plućne funkcije su prikazane u tabeli 12. Postojala je negativna statistički značajna povezanost između MMP-9 i sledećih parametara spirometrije: FEV1/FVC, FVC (%), FEV 1 (%) i MEF 50. Nije bilo statistički značajne povezanosti MMP-9 sa FVC (L), FEV1 (L), PEF i MEF 25. Postojala je negativna statistički značajna povezanost između MMP-9 i saturacije, sa porastom MMP-9 opadala je vrednost saturacije kiseonika.

Nije bilo statistički značajne povezanosti MMP-9 sa parametrima difuzijskog kapaciteta za CO. Sledeći parametri telesne pletizmografije su bili pozitivno povezani sa vrednostima MMP-9: TLC (L), ITGV (L), RV (%), RV (L), VC (%), ERV (L), RV%TLC, sa porastom MMP-9 rasli su i navedeni parametri telesne pletizmografije (grafici 11-16). Postojala je negativna statistički značajna povezanost MMP-9 sa VC(%) i IC (%). Drugi parametri telesne pletizmografije nisu statistički značajno bili povezani sa MMP-9.

TIMP-1 nije bio statistički značajno povezan sa parametrima spirometrije, difuzijskog kapaciteta za CO, pulsne oksimetrije i telesne pletizmografije.

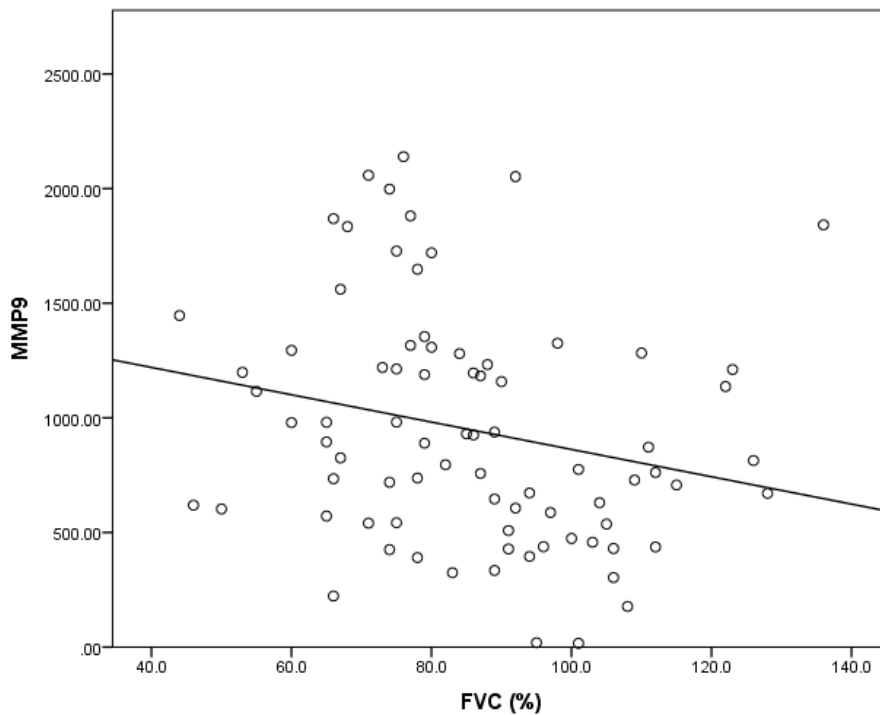
Postojala je negativna statistički značajna povezanost između MMP-9/TIMP 1 i sledećih parametara spirometrije: FEV1/FVC, FVC (%), FEV 1%, FEV 1 (L), MEF 50, MEF 25. Nije bilo statistički značajne povezanosti MMP-9/TIMP-1 sa FVC (L) i PEF . Postojala je negativna statistički značajna povezanost između MMP-9/TIMP-1 i saturacije, sa porastom MMP-9/TIMP-1 opadala je vrednost saturacije kiseonika. Nije bilo statistički značajne povezanosti MMP-9/TIMP-1 sa parametrima difuzijskog kapaciteta za CO. Sledeći parametri telesne pletizmografije su bili pozitivno povezani sa vrednostima MMP-9/TIMP-1: ITGV (%), ITGV (L), RV (%), RV (L), VC (%), RV%TLC, sa porastom MMP-9/TIMP-1 rasli su i navedeni parametri telesne pletizmografije. Postojala je negativna statistički značajna povezanost MMP-9/TIMP-1 sa VC (%) i IC (%). Drugi parametri telesne pletizmografije nisu statistički značajno bili povezani sa MMP-9.

Tabela 12. Korelacije između sistema proteaza/antiproteaza i pokazatelja plućne funkcije

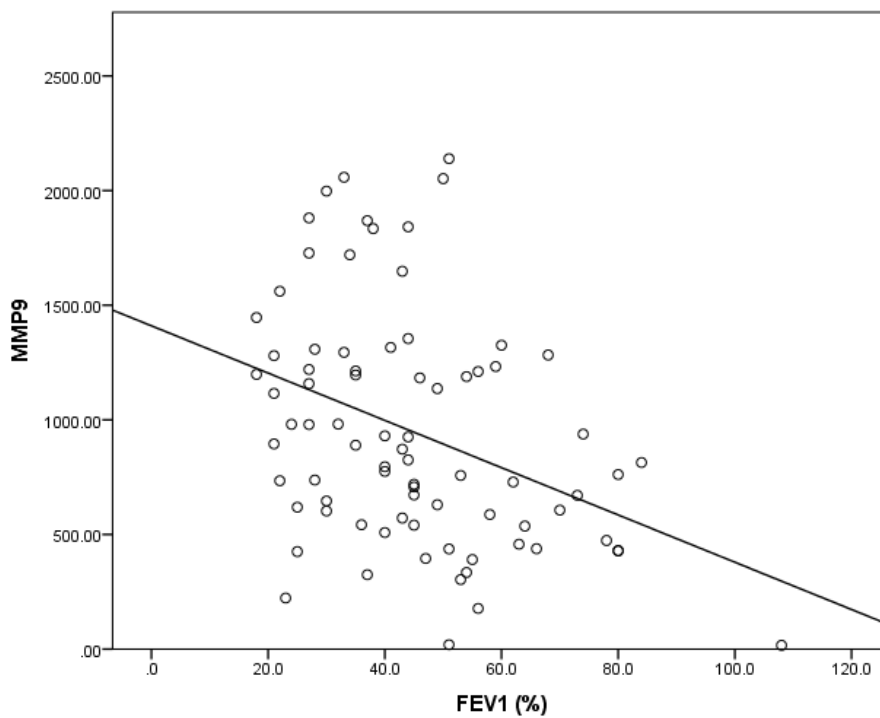
	MMP-9		TIMP-1		MMP9/TIMP1	
	r	p	r	p	r	p
FEV1/FVC	-0.308	0.005	-0.085	0.456	-0.330	0.003
FVC (%)	-0.294	0.008	-0.043	0.704	-0.282	0.011
FVC (L)	0.032	0.777	0.183	0.107	-0.070	0.540
FEV1 (%)	-0.367	0.001	-0.054	0.636	-0.392	0.000
FEV1 (L) *	-0.171	0.130	0.058	0.608	-0.253	0.024
PEF	-0.154	0.171	0.033	0.773	-0.204	0.069
MEF 50 *	-0.288	0.010	0.011	0.924	-0.334	0.002
MEF 25 *	-0.178	0.127	0.091	0.439	-0.243	0.036
SATURACIJA O <sub>2</sub> (%)*	-0.257	0.021	-0.064	0.570	-0.259	0.020
S.FREKVENCA (OTKCAJ/MIN) *	0.208	0.064	0.018	0.871	0.214	0.056
DLCO	-0.154	0.172	-0.117	0.302	-0.153	0.175
KCO	-0.033	0.770	-0.078	0.496	-0.036	0.756
TLC (%)*	0.012	0.918	-0.119	0.293	0.105	0.355
TLC (L) *	0.228	0.045	0.128	0.265	0.165	0.148
ITGV (%)*	0.181	0.108	-0.018	0.873	0.226	0.044
ITGV (L) *	0.354	0.001	0.114	0.313	0.315	0.004
RV(%)*	0.220	0.050	-0.031	0.786	0.277	0.013
RV (L)	0.319	0.004	0.080	0.480	0.320	0.004
VC (%)*	-0.323	0.003	-0.152	0.178	-0.263	0.018
VC (L)	-0.004	0.974	0.100	0.377	-0.076	0.503
ERV (%)*	0.106	0.355	0.075	0.515	0.069	0.550
ERV (L) *	0.246	0.030	0.132	0.248	0.178	0.119
RV%TLC *	0.308	0.005	0.015	0.895	0.335	0.002
R <sub>tot</sub>	0.113	0.317	-0.008	0.944	0.163	0.150
R <sub>tot</sub> (%)	0.111	0.326	-0.034	0.767	0.175	0.121
IC (%)	-0.359	0.001	-0.148	0.189	-0.291	0.009
IC (L)	-0.156	0.168	0.002	0.986	-0.172	0.127



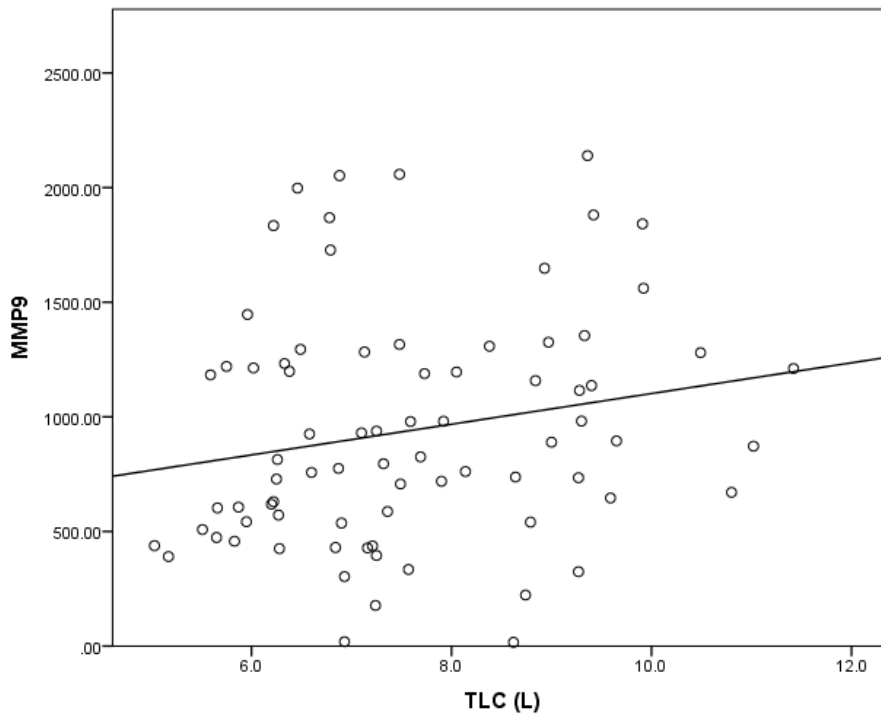
Grafik 11. Korelacija MMP-9 i FVC (%)



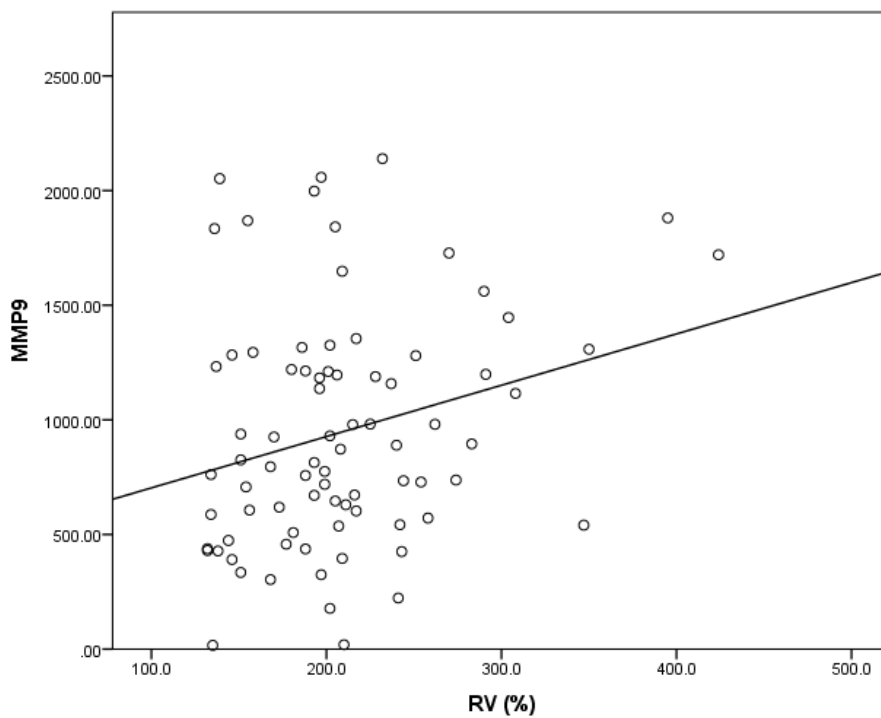
Grafik 12. Korelacija MMP-9 i FEV1 (%)



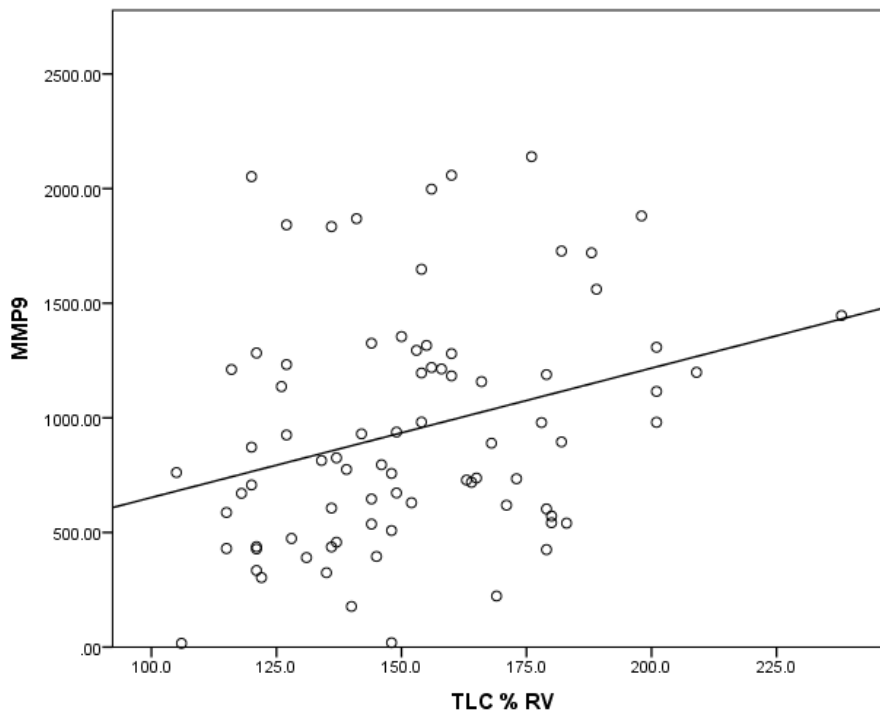
Grafik 13. Korelacija MMP-9 i TLC (L)



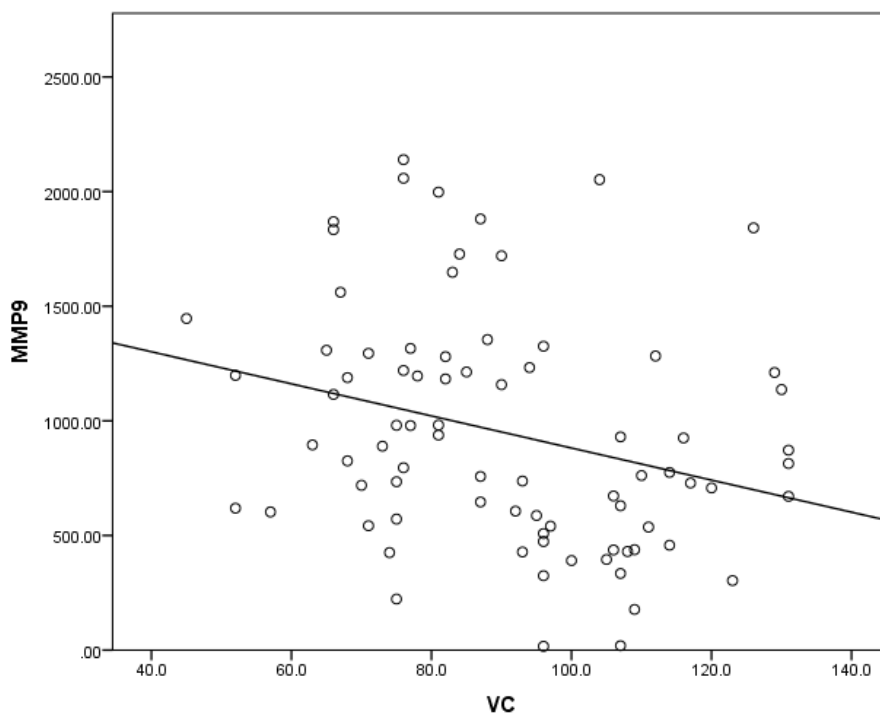
Grafik 14. Korelacija MMP-9 i RV (%)



Grafik 15. Korelacija TLC%RV sa MMP-9



Grafik 16. Korelacija MMP-9 i VC (%)



Korelacije između inflamatornih faktora i pokazatelja plućne funkcije su prikazane u tabeli 13.

Vrednost CRP je pozitivno statistički značajno bio povezan sa srčanom frekvencom. Viša vrednost CRP je bila udružena sa višom srčanom frekvencom. CRP nije bio statistički značajno povezan sa ostalim parametrima pulsne oksimetrije, spirometrije, difuzijskog kapaciteta za CO i telesne pletizmografije. Vrednosti leukocita i neutrofila nisu bile statistički značajno povezane sa vrednostima spirometrije i difuzijskog kapaciteta za CO. Vrednosti leukocita i neutrofila su bile negativno statistički značajno povezane sa saturacijom kiseonika, više vrednosti ovih parametara su bile udružene sa nižom saturacijom. Postojala je statistički značajna povezanost sledećih parametara telesne pletizmografije sa vrednostima leukocita i neutrofila: ITGV (%), ITGV (L), RV(%), RV (L). Drugi parametri telesne pletizmografije nisu statistički značajno bili povezani sa vrednostima leukocita i neutrofila. Vrednosti neutrofila merene u % nisu bile statistički značajno povezane sa parametrima spirometrije, difuzijskog kapaciteta za CO, pulsne oksimetrije i telesne pletizmografije.

Tabela 13. Korelacije između inflamatornih faktora i pokazatelja plućne funkcije

	CRP		leukociti		neutrofil %		neutrofil	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FEV1/FVC	-0.013	0.897	-0.178	0.083	-0.118	0.250	-0.203	0.047
FVC (%)	-0.044	0.665	0.005	0.965	0.036	0.724	0.000	1.000
FVC (L)	0.053	0.606	0.094	0.363	0.012	0.906	0.062	0.554
FEV1 (%)	-0.015	0.884	-0.136	0.187	-0.082	0.427	-0.161	0.117
FEV1 (L) *	0.030	0.770	-0.046	0.659	-0.082	0.427	-0.095	0.356
PEF	0.022	0.832	-0.065	0.526	-0.004	0.970	-0.058	0.576
MEF 50 *	0.028	0.784	-0.104	0.318	-0.105	0.307	-0.148	0.152
MEF 25 *	0.193	0.068	-0.067	0.533	-0.019	0.858	-0.060	0.578
SATURACIJA O <sub>2</sub> (%)*	-0.044	0.672	-0.249	0.015	-0.197	0.055	-0.273	0.007
S.FREKVENCA (OTKCAJ/MIN) *	0.222	0.029	0.098	0.345	0.106	0.302	0.107	0.302
DLCO	0.074	0.472	-0.082	0.428	-0.140	0.172	-0.115	0.266

KCO	0.099	0.345	-0.084	0.427	-0.188	0.071	-0.108	0.308
TLC (%)*	-0.081	0.435	0.198	0.057	0.112	0.283	0.194	0.062
TLC (L) *	-0.001	0.994	0.180	0.090	0.045	0.672	0.148	0.164
ITGV (%)*	-0.047	0.649	0.263	0.011	0.171	0.099	0.280	0.007
ITGV (L) *	0.003	0.978	0.276	0.007	0.146	0.159	0.281	0.006
RV(%)*	0.004	0.968	0.241	0.020	0.118	0.257	0.240	0.020
RV (L)	0.025	0.809	0.288	0.005	0.120	0.248	0.291	0.005
VC (%)*	-0.067	0.519	-0.098	0.348	0.015	0.884	-0.099	0.343
VC (L)	-0.003	0.976	-0.001	0.990	-0.032	0.763	-0.041	0.693
ERV (%)*	0.063	0.552	0.105	0.324	0.156	0.138	0.125	0.238
ERV (L) *	0.115	0.275	0.167	0.114	0.133	0.206	0.156	0.141
RV%TLC *	0.041	0.698	0.153	0.143	0.074	0.479	0.153	0.142
Rtot	0.018	0.864	0.056	0.591	-0.058	0.581	0.053	0.612
Rtot (%)	-0.003	0.978	0.047	0.656	-0.062	0.553	0.044	0.673
IC (%)	-0.073	0.488	-0.105	0.317	-0.105	0.317	-0.143	0.174
IC (L)	-0.026	0.807	-0.071	0.503	-0.113	0.282	-0.120	0.255

Korelacije između inflamatornih faktora i pokazatelja plućne funkcije su prikazane u tabeli 14. Vrednosti eozinofila, apsolutne i procentualne su statistički značajno korelisale sa IC (%). Nije bilo statistički značajne povezanosti vrednosti eozinofila sa parametrima spirometrije, difuzijskog kapaciteta za CO, pulsne oksimetrije i drugim parametrima telesne plezmiografije. Postojala je pozitivna statistički značajna povezanost Hgb sa FVC (L), TLC (L), ITGV (L), RV(%), RV (L) i VC (L), više vrednosti Hgb su bile udružene sa višim vrednostima ovih parametara.

Tabela 14. Korelacije između inflamatornih faktora i pokazatelja plućne funkcije

	eozinofili%		eozinofili		HGB	
	r	p	r	p	r	p
FEV1/FVC	-0.017	0.872	-0.036	0.731	-0.184	0.072
FVC (%)	0.018	0.861	0.102	0.325	-0.057	0.579
FVC (L)	0.029	0.780	-0.005	0.965	0.218	0.034
FEV1 (%)	0.005	0.961	0.041	0.692	-0.160	0.120
FEV1 (L) *	-0.016	0.879	-0.064	0.538	0.069	0.506

PEF	-0.002	0.983	-0.083	0.424	-0.026	0.803
MEF 50 *	-0.016	0.877	-0.020	0.848	-0.047	0.648
MEF 25 *	-0.048	0.656	-0.024	0.826	-0.031	0.771
SATURACIJA O <sub>2</sub> (%)*	-0.091	0.380	-0.167	0.106	-0.125	0.227
S.FREKVENCA (OTKCAJ/MIN) *	0.074	0.473	0.075	0.468	0.071	0.497
DLCO	0.092	0.371	0.100	0.330	0.003	0.973
KCO	0.024	0.819	0.039	0.709	-0.043	0.684
TLC (%)*	0.090	0.389	0.139	0.182	0.166	0.112
TLC (L) *	0.082	0.442	0.019	0.855	0.390	<0.001
ITGV (%)*	-0.019	0.853	0.024	0.820	0.168	0.107
ITGV (L) *	0.009	0.933	0.009	0.930	0.308	0.003
RV(%)*	0.042	0.688	0.066	0.527	0.222	0.032
RV (L)	0.044	0.678	0.057	0.587	0.313	0.002
VC (%)*	0.077	0.466	0.133	0.203	-0.125	0.231
VC (L)	0.085	0.420	0.009	0.933	0.218	0.036
ERV (%)*	-0.047	0.660	0.075	0.479	-0.196	0.063
ERV (L) *	0.018	0.868	0.045	0.669	0.105	0.321
RV%TLC *	-0.008	0.942	-0.006	0.955	0.193	0.064
Rtot	-0.062	0.554	-0.061	0.564	0.009	0.929
Rtot (%)	-0.050	0.637	-0.052	0.621	0.000	0.997
IC (%)	0.208	0.047	0.227	0.029	-0.072	0.495
IC (L)	0.145	0.169	0.066	0.533	0.121	0.251

#### 4.2.2 Korelacija između pokazatelja inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza

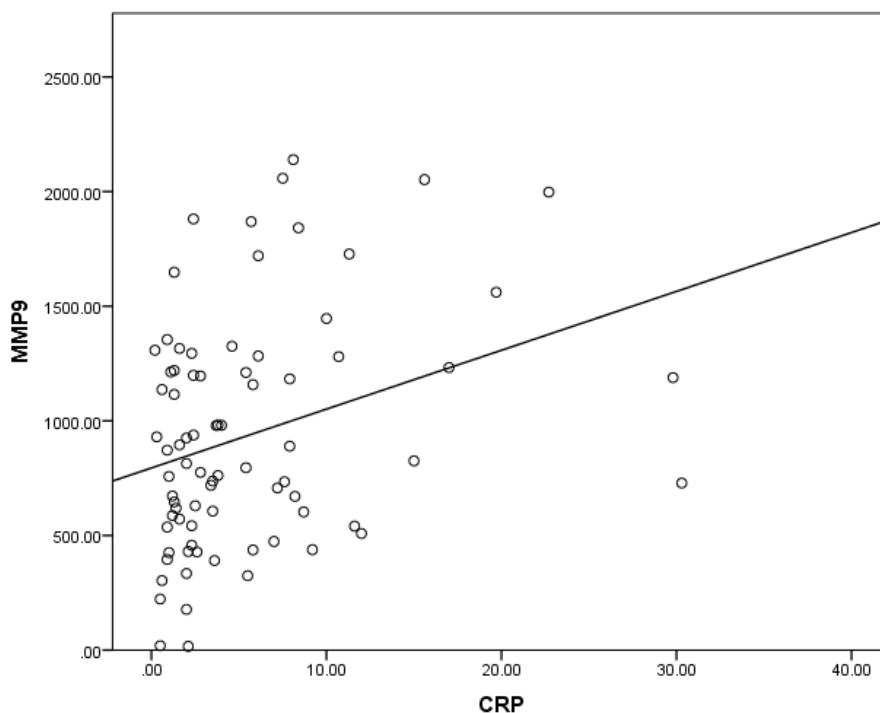
Ispitivane su korelacije između pokazatelja inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza, rezultati su prikazani u tabeli 15. MMP-9 i TIMP-1 su pozitivno statistički značajno bili povezani sa vrednostima CRP (grafik 17), leukocitima i neutrofilima (% i apsolutni broj). MMP-9/TIMP-1 je bio pozitivno statistički značajno povezan sa leukocitima i apsolutnim brojem neutrofila. Nije

bilo statistički značajne povezanosti MMP-9/TIMP-1 sa CRP, neutrofilima %, eozinofilima. Hgb je pozitivno statistički značajno bio povezan sa sva tri parametra.

Tabela 15. Korelacije između pokazatelja inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza

	MMP9		TIMP1		mmpTIMP	
CRP	0.301	0.007	0.370	0.001	0.164	0.148
leukociti	0.462	<0.001	0.293	0.009	0.339	0.002
neutrofili %	0.315	0.005	0.225	0.046	0.194	0.086
neutrofili1	0.478	<0.001	0.346	0.002	0.322	0.004
eozinofili %	-0.140	0.222	-0.175	0.125	-0.038	0.743
eozinofili1	0.016	0.890	0.007	0.949	0.045	0.698
HGB	0.352	0.002	0.263	0.020	0.243	0.032

Grafik 17. Korelacija MMP-9 i CRP



#### 4.2.3. Korelacija BMI sa funkcijskim i inflamatornim pokazateljima i matriks-metaloproteinazama

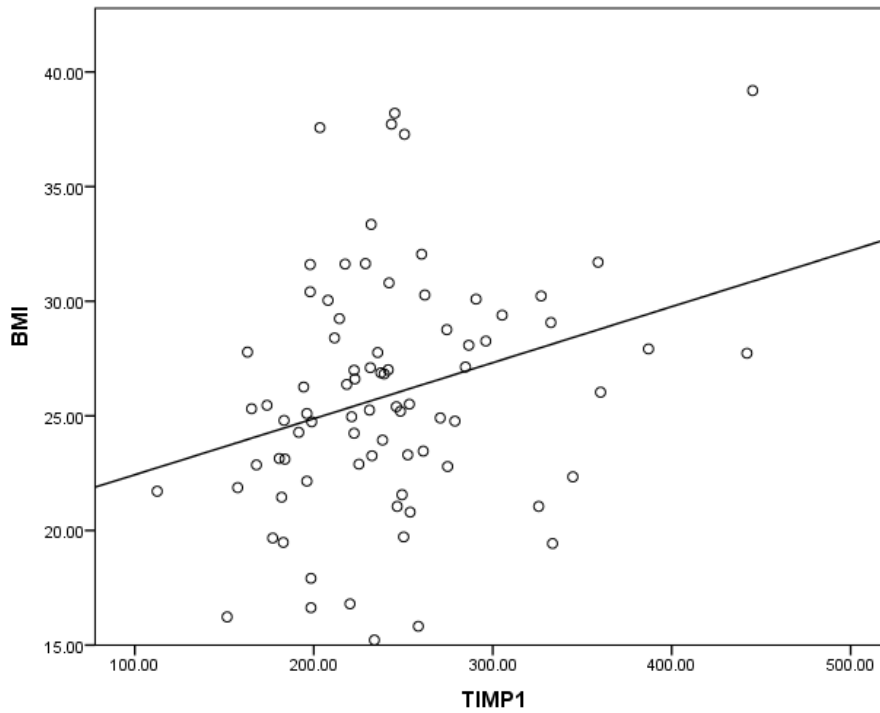
Ispitivana je korelacija BMI sa matriksmetaloproteinazama i inflamatornim faktorima, rezultati su prikazani u tabeli 16. Postojala je pozitivna, statistički značajna povezanost BMI i TIMP-1, grafik 18. Nivo CRP je bio pozitivno statistički značajno povezan sa TIMP-1, grafik 19. Nije bilo statistički značajne povezanosti između BMI i vrednosti MMP-9, MMP-9/TIMP-1 kao ni vrednostima leukocita, neutrofila, eozinofila i hemoglobina.

Tabela 16. Korelacija BMI sa matriksmetaloproteinazama i inflamatornim faktorima

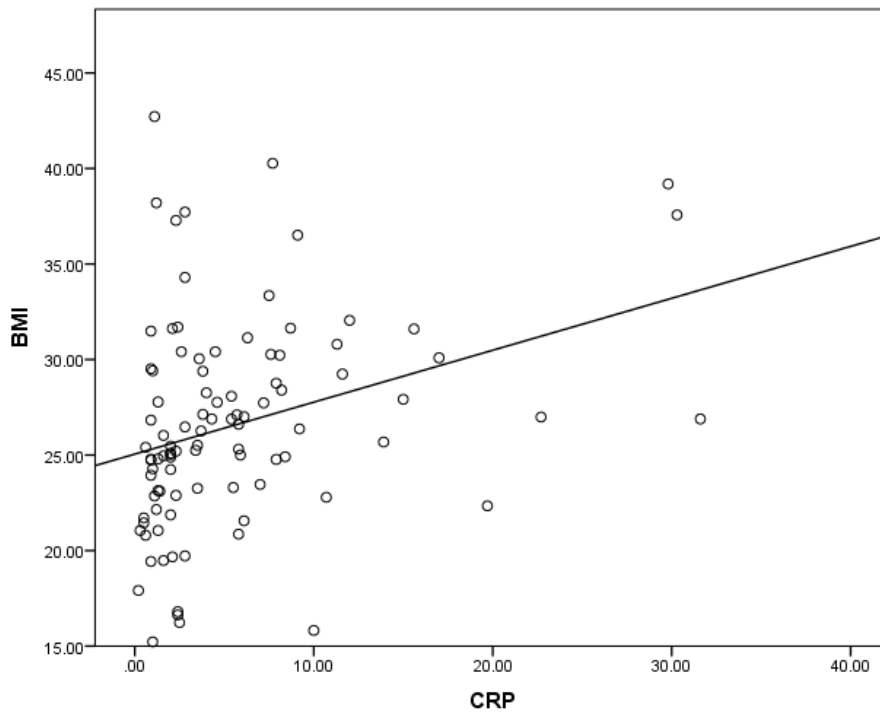
	BMI	
	r	p
MMP9	0.157	0.164
TIMP1	0.289	0.009
mmpTIMP	0.043	0.703
CRP	0.390	<0.001
leukociti	0.024	0.815
neutrofili %	-0.090	0.380
neutrofili l	-0.019	0.851
eozinofili %	0.122	0.238
eozinofili l	0.101	0.329
HGB	0.114	0.271



Grafik 18. Korelacija BMI i TIMP-1



Grafik 19. Korelacija BMI i CRP



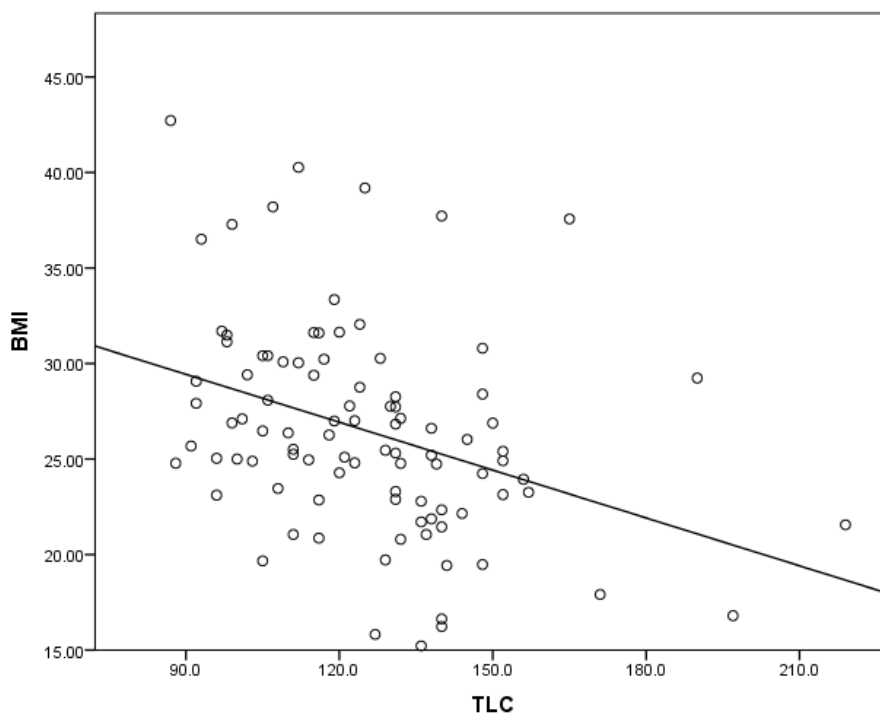
Ispitivana je korelacija BMI sa matriksmetaloproteinazama i inflamatornim faktorima, rezultati su prikazani u tabeli 17. Postojala je pozitivna statistički značajna povezanost između BMI sa FEV1/FVC, FEV 1 (L) (grafik 20), MEF 50. Nije bilo statistički značajne povezanosti BMI sa FVC (% i L), PEF i MEF 25. Parametri pluske oksimetrije nisu bili statistički značajno povezani sa BMI. Parametri difuzijskog kapaciteta za CO su bili pozitivno statistički značajno povezani sa BMI. Parametri telesne pletizmografije: TLC (%) (grafik 21), IGTV (% i L), RV (% i L) (grafik 22) su bili negativno, statistički značajno povezani sa BMI. Nije bilo statistički značajne povezanosti između TLC (L), i VC (L i %) sa BMI.

Tabela 17. Korelacija BMI sa plućnim parametrima

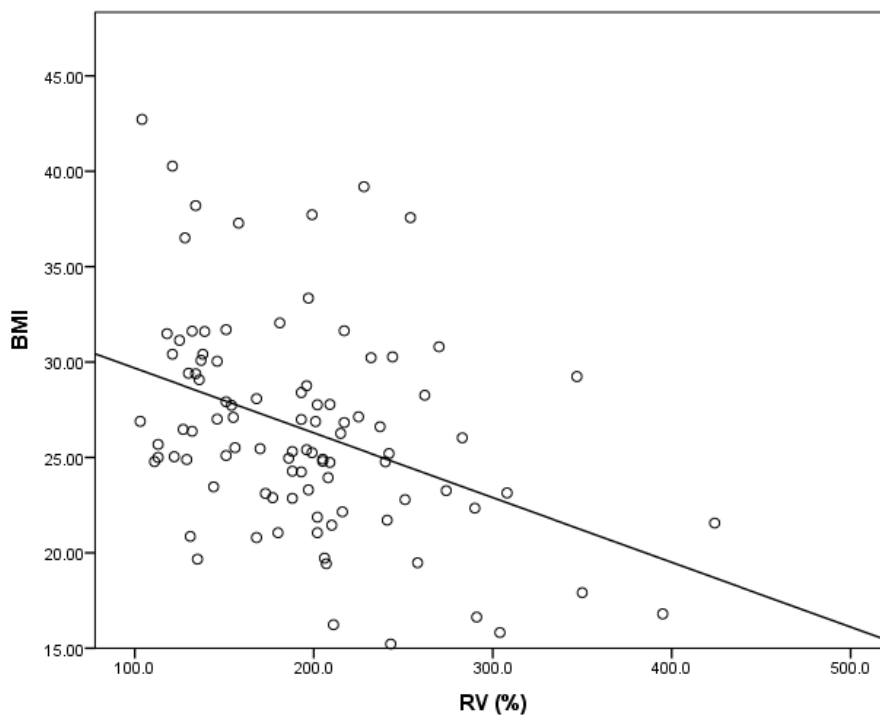
BMI		
FEV1/FVC	0.299	0.003
FVC (%)	0.050	0.627
FVC (L)	0.145	0.156
FEV1 (%)	0.244	0.016
FEV1 (L) *	0.283	0.005
PEF	0.168	0.099
MEF 50 *	0.202	0.047
MEF 25 *	0.078	0.462
SATURACIJA O <sub>2</sub> (%)*	0.011	0.915
S.FREKVENCA (OTKCAJ/MIN) *	0.110	0.283
DLCO	0.358	<0.001
KCO	.419	<0.001
TLC (%)*	-.360	<0.001
TLC (L) *	-0.130	0.218
ITGV (%)*	-.464	<0.001
ITGV (L) *	-.316	0.002
RV(%)*	-.394	<0.001
RV (L)	-.324	0.001

VC (%)*	0.053	0.611
VC (L)	0.183	0.076
ERV (%)*	-0.127	0.225
ERV (L) *	-0.013	0.904
RV%TLC *	-0.313	0.002
Rtot	-0.037	0.720
Rtot (%)	-0.040	0.701
IC (%)	0.212	0.040
IC (L)	.302**	0.003

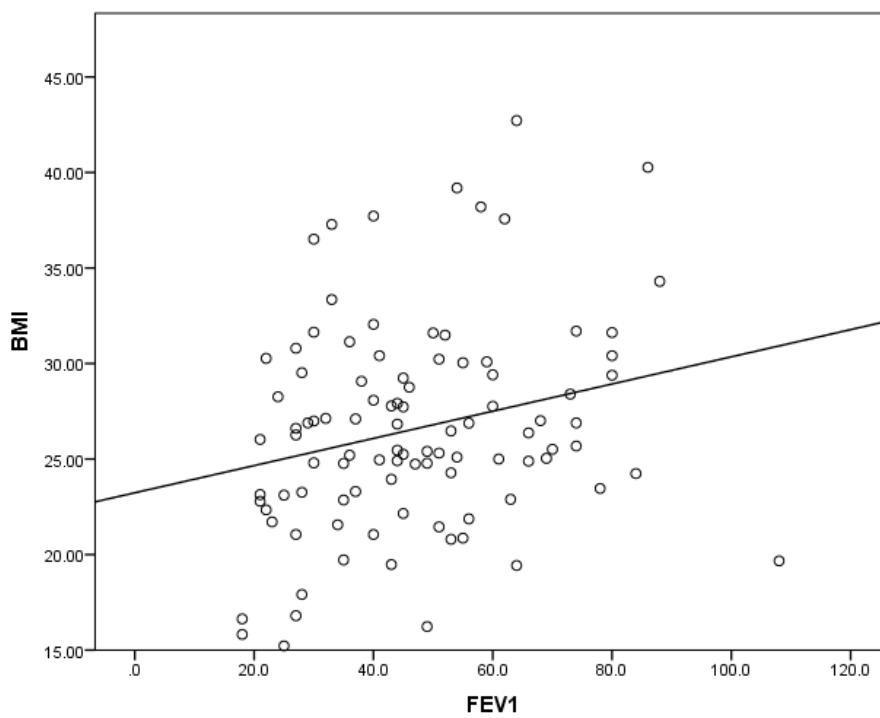
Grafik 20. Korelacija BMI i TLC



Grafik 21. Korelacija BMI i RV (%)



Grafik 22. Korelacija BMI i FEV1



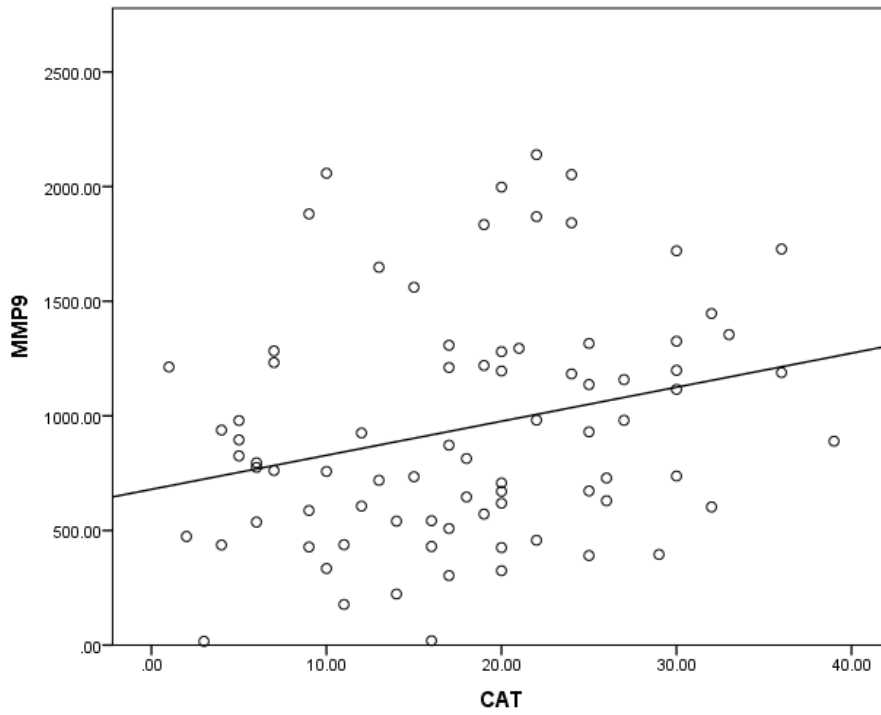
#### 4.2.4. Korelaciju CAT i MMRC skora sa matriksmetaloproteinazama i inflamatornim pokazateljima

Ispitivana je povezanost CAT i MMRC skora sa matriksmetaloproteinazama i inflamatornim pokazateljima, rezultati su prikazani u tabeli 18. CAT skor je pozitivno, statistički značajno bio povezan sa MMP-9 i MMP-9/TIMP-1, viša vrednost skora je bila povezana sa višim vrednostima matriksmetaloproteinazama, grafik 23. Nije bilo statistički značajne povezanosti CAT skora i inflamatornih parametara. mMRC skor je pozitivno, statistički značajno bio povezan sa MMP-9 i MMP-9/TIMP-1, viša vrednost skora je bila povezana sa višim vrednostima matriksmetaloproteinazama. Takođe, mMRC skor je pozitivno, statistički značajno bio povezan sa neutrofilima (apsolutni broj i %) i vrednostima hemoglobina. Nije bilo statistički značajne povezanosti MMRC sa CRP, leukocitima i eozinofilima.

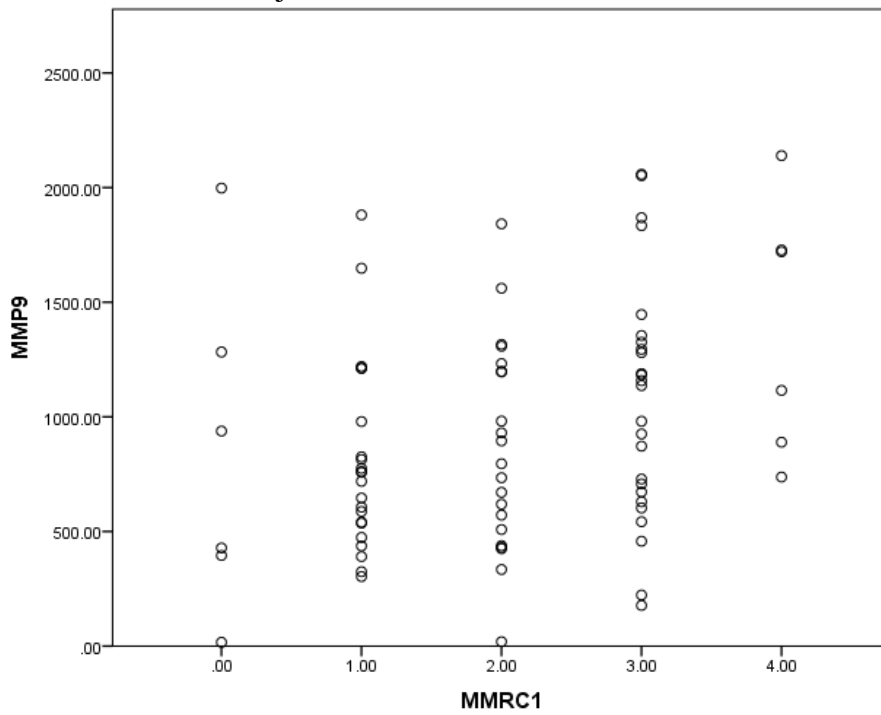
Tabela 18. Korelacija CAT i MMRC skora sa matriksmetaloproteinazama i inflamatornim pokazateljima

	CAT		MMRC	
	r	p	r	p
MMP9	0.273	0.014	0.288	0.010
TIMP1	0.053	0.641	0.103	0.365
mmpTIMP	0.312	0.005	0.281	0.011
CRP	0.130	0.206	0.096	0.352
leukociti	0.088	0.393	0.190	0.063
neutrofili %	0.112	0.273	0.247	0.015
neutrofili l	0.122	0.235	0.259	0.011
eozinofili %	0.037	0.720	0.085	0.409
eozinofili l	0.129	0.209	0.177	0.085
HGB	0.138	0.180	0.242	0.017

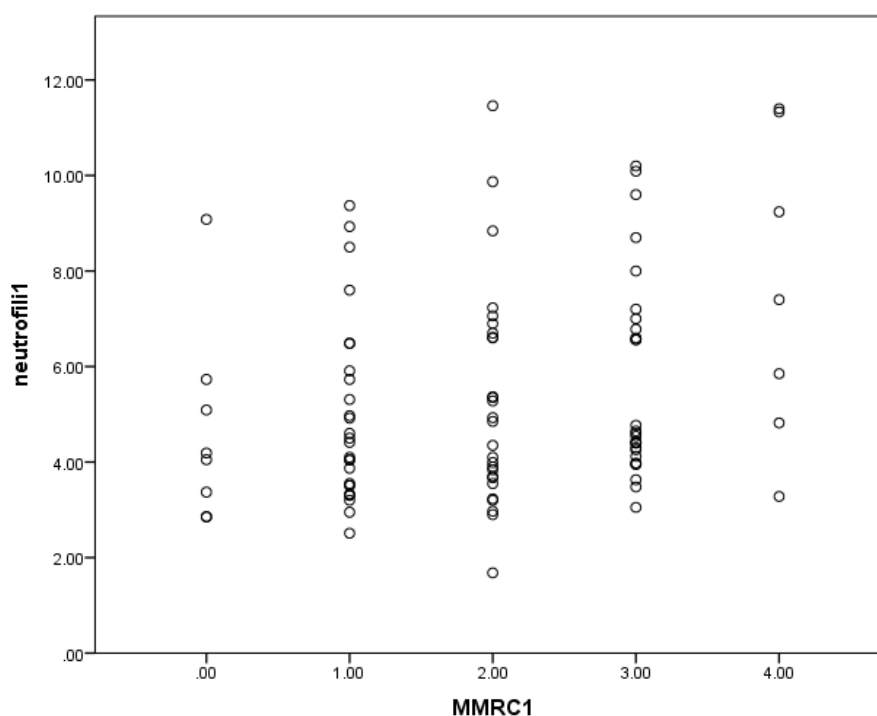
Grafik 23. Korelacija CAT i MMP-9



Grafik 24. Korelacija mMRC i MMP-9



Grafik 25. Korelacija mMRC i neutrofila



### 4.3. Ispitivanje prema kategorijama

#### 4.3.1. Ispitivanje pokazatelja plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema GOLD stadijumima

Ispitivani su parametri plućne funkcije kod bolesnika sa HOBP. Bolesnici su prema GOLD stadijumu podeljeni u dve grupe, u prvoj grupi je bilo 40 bolesnika sa GOLD stadijumom 1 i 2, a u drugoj 58 bolesnika sa uznapredovalim stadijumom 3 i 4, tabela 19. Parametri mereni spirometrijom su bili statistički značajno viši kod bolesnika nižim GOLD stadijumom bolesti. Saturacija kisenonika je bila statistička značajno viša kod bolesnika nižim GOLD stadijumom. Nije bilo statistički značajne razlike u minimalnoj srčanoj frekvenci između dve grupe. Parametri difuzijskog kapaciteta za ugljenmonoksid (CO) DLCO (%) i KCO (%) su bili statistički značajno viši kod bolesnika sa nižim GOLD stadijumom. Parametri telesne pletizmografije: TLC (%), TLC (L), ITGV (%), ITGV (L), RV (%), RV (L) su bili statistički značajno viši u grupi bolesnika sa uznapredovalim GOLD stadijumom bolesti. VC(%) i VC (L) su bili statistički značajno viši u grupi bolesnika sa nižim

GOLD stadijumom. Nije bilo statistički značajne razlike u ERV (%) i ERV (L) parametrima između dve grupe. RV%TL, Rtot su bili statistički značajno viši u grupi pacijenata sa GOLD stadijumom 3 i 4. IC (%) i IC (L) su bili statistički značajno niži u grupi pacijenata sa višim GOLD stadijumom.

Tabela 19. Parametri plućne funkcije prema GOLD stadijumima

	Gold 1 i 2 N=40	Gold 3 i 4 N=58	p
Spirometrija			
FEV1/FVC	53.9 ± 10.4	36.7 ± 8.6	<0.001
FVC	98.4 ± 12.9	76.8 ± 18.3	<0.001
FVC (L)	3.3 ± 0.9	2.6 ± 0.8	<0.001
FEV1	65.3 ± 13	34.4 ± 8.9	<0.001
FEV1(L)	1.8 ± 0.6	0.9 ± 0.3	<0.001
PEF	69.7 ± 20.6	43.3 ± 13.5	<0.001
MEF50	20.0 (13.5)	8.0 (4.0)	<0.001
MEF25	20.5 (8.8)	10.0 (8.0)	<0.001
Pulsna oksimetrija			
SAT (%)	95.3 ± 2.8	93.2 ± 3.5	0.003
SF (BR/MIN)	80.1 ± 11.6	83 ± 12.2	0.241
Difuzijski kapacitet za CO			
DLCO (%)	61.7 ± 20.1	42.2 ± 19.3	<0.001
KCO (%)	69.6 ± 19.9	54.5 ± 25.1	0.002
Telesna pletizmografija			
TLC (%)	117.4 ± 18	131.1 ± 25.4	0.005
TLC (L)	6.9 ± 1.5	7.6 ± 1.6	0.037
ITGV (%)	140.3 ± 26.7	185 ± 45.7	<0.001
ITGV (L)	4.4 ± 1.1	5.8 ± 1.4	<0.001
RV (%)	157.2 ± 38.9	220.7 ± 64.3	<0.001
RV (L)	3.5 ± 0.8	4.8 ± 1.3	<0.001
VC (%)	101.8 ± 14.7	84 ± 19.2	<0.001
VC (L)	3.4 ± 1	2.9 ± 0.9	0.005
ERV (%)	105.0 (63.8)	100.0 (71.0)	0.836
ERV (L)	1 ± 0.6	1 ± 0.5	0.934



RV%TL	127.4 ± 18.8	159.6 ± 26	<0.001
Rtot	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.3	<0.001
R tot (%)	127.2 ± 52.5	230 ± 97.4	<0.001
IC (%)	99 ± 32.1	75.3 ± 24.3	<0.001
IC (L)	2.44 ± 0.70	1.93 ± 0.70	0.001

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± sd, a testirani Studentovim T testom za nezavisne uzorke; ¥ podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg) a testirani Mann-Whitney U testom

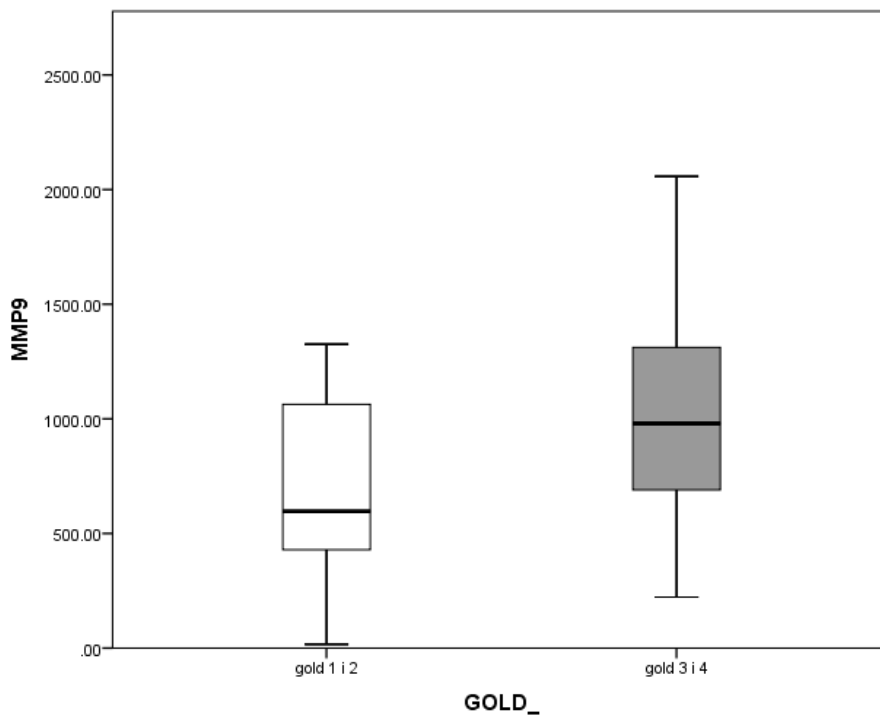
Ispitivani su parametri inflamacije i sistema proteaza/antiproteza kod bolesnika prema GOLD stadijumima, rezultati su prikazani u tabeli 20. Vrednosti leukocita, neutrofila, limfocita, eozinofila (apsolutne i procentulane) se nisu statistički značajno razlikovale između grupa. Medijana CRP je bila slična između grupa, nije bili statistički značajne razlike. Vrednosti MMP-9 i MMP-9/TIMP-1 su bile statistički značajno više u grupi pacijenata sa GOLD stadijumom 3 i 4, grafik 27-30. Prosečne vrednosti TIMP se nisu statistički značajno razlikovale između grupa.

Tabela 20. Parametri inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema GOLD stadijumima

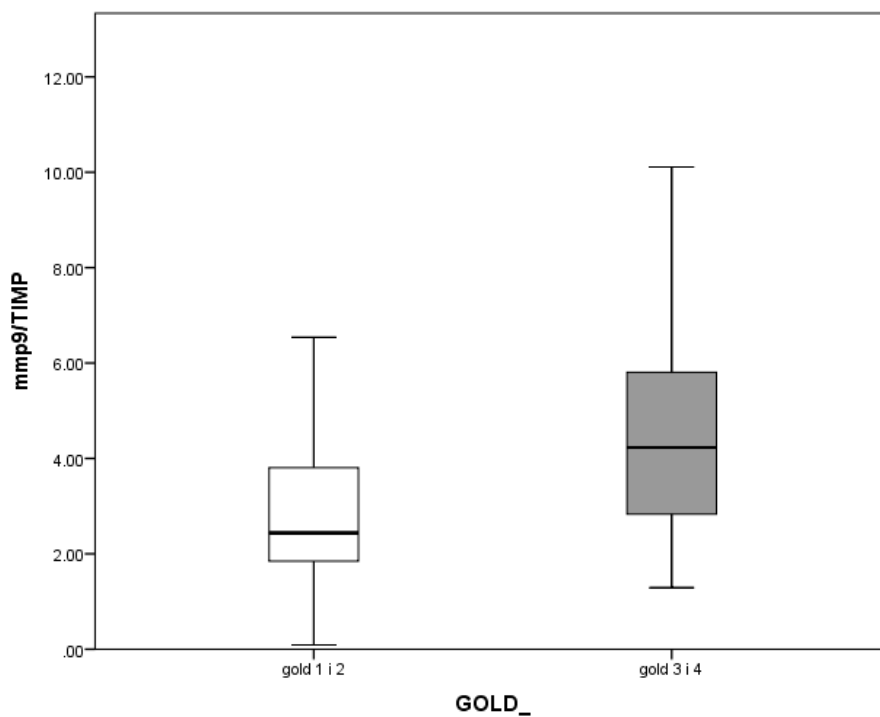
	Gold 1 i 2 N=40	Gold 3 I 4 N=58	p
leukociti	7.9 ± 2.4	8.7 ± 2.8	0.131
neutrofili %	62.6 ± 11.3	62.2 ± 12.4	0.864
limfociti %	26.7 ± 10.5	25.5 ± 7.6	0.510
eozinofili %	2.5 ± 1.9	2.3 ± 1.4	0.495
neutrofili l	5 ± 2.1	5.7 ± 2.4	0.186
limfociti l	2 ± 1	2.2 ± 0.7	0.482
eozinofili l	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.396
CRP ¥	3.5 (5.8)	2.8 (6.3)	0.834
MMP-9 ¥	596.8 (69.4)	979.6 (635.6)	0.003
TIMP1	241.5 ± 64.5	242.8 ± 59.7	0.929
mmpTIMP ¥	2.4 (2.05)	4.2 (3.2)	0.001

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± sd, a testirani Studentovim T testom za nezavisne uzorke; ¥ podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg) a testirani Mann-Whitney U testom

Grafik 27. MMP-9 prema GOLD stadijumima



Grafik 28. MMP-9/TIMP-1 prema GOLD stadijumima



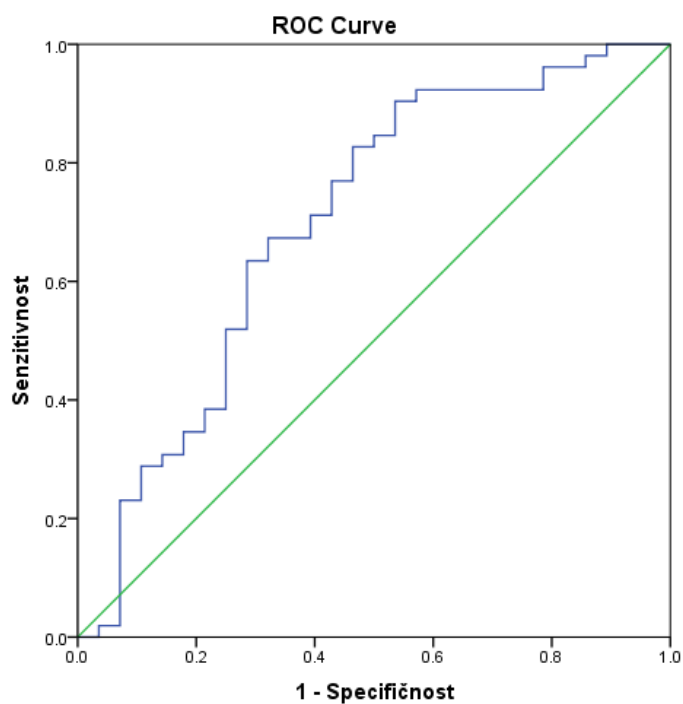
Ispitivane su senzitivnost i specifičnost MMP9 u dijagnozi uznapredovalih stadijuma HOBP, GOLD 3 I 4, rezultati su prikazani u tabeli x, grafik 25.

Tabela 21. Površina ispod krive za MMP-9

Površina ispod krive	p	95 % CI	
		Donja granica	Gornja granica
0.699	0.003	0.571	0.828

Vrednost MMP-9 jednaka ili visa od 731.5 je bila senzitivna 71 % a specifična u 61 % za postavljanje dijagnoze GOLD 3 i 4.

Grafik 29. Površina ispod krive za MMP-9



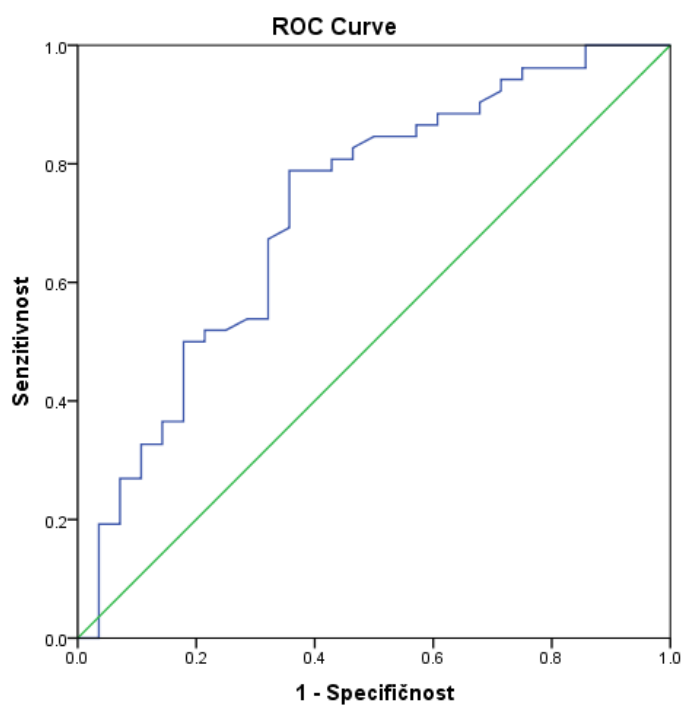
Ispitivane su senzitivnost i specifičnost MMP-9/TIMP-1 u dijagnozi uznapredovalih stadijuma HOBP, GOLD 3 i 4, rezultati su prikazani u tabeli 22, grafik 26.

Tabela 22. Površina ispod krive za MMP-9/TIMP-1

Površina ispod krive	p	95 % CI	
		Donja granica	Gornja granica
0.722	0.001	0.601	0.843

Vrednost MMP-9/TIMP-1 jednaka ili visa od 2.83 je bila senzitivna 75 % a specifična u 64 % za postavljanje dijagnoze GOLD 3 i 4.

Grafik 30. Površina ispod krive za MMP-9/TIMP-1

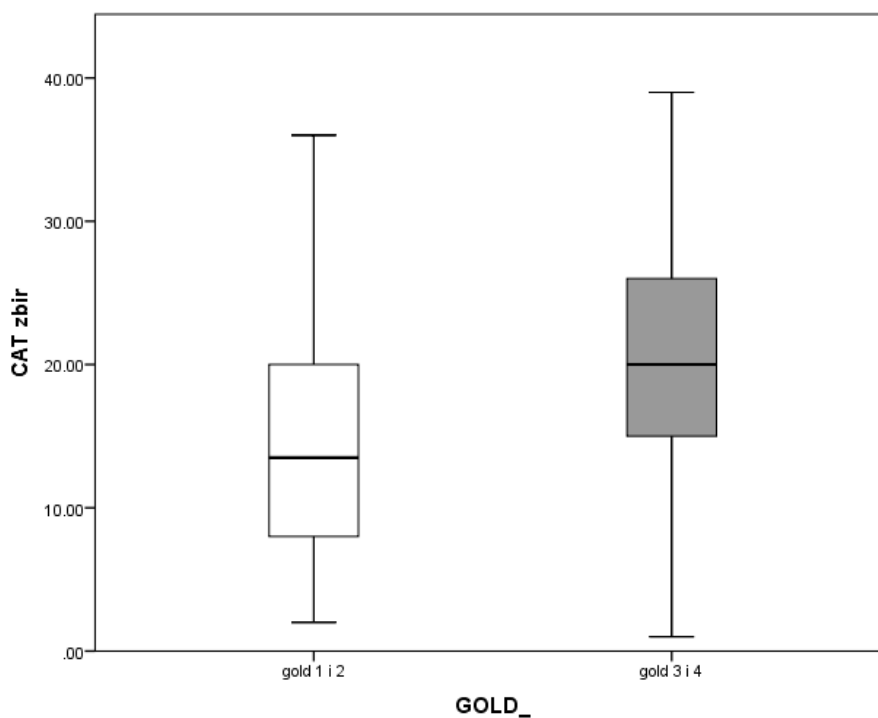


Ispitivanje obima simptoma (CAT upitnik) i intenziteta dispneje (MMRC skala dispneje) prema GOLD stadijumima, rezultati su prikazani u tabeli 23. Postojala je statistički značajna razlika u skorovima, pacijenti sa GOLD stadijumom 3 i 4 su imali više CAT i mMRC skorove, grafik 31-32.

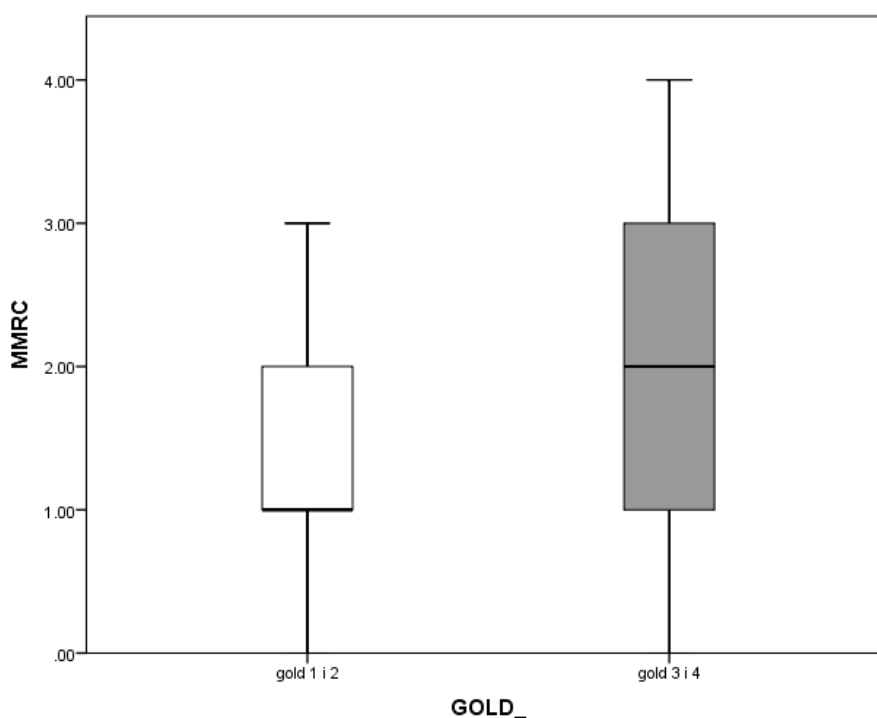
Tabela 23. Obim simptoma (CAT upitnik) i intenzitet dispneje (MMRC) prema GOLD stadijumima

	Gold 1 i 2 N=40	Gold 3 i 4 N=58	p
CAT zbir	13.5 (8-20)	20 (15-26)	0.002
MMRC	1 (1-2)	2 (1-3)	0.003

Grafik 31. Obim simptoma (CAT upitnik) prema GOLD stadijumima



Grafik 32. Intenzitet dispneje (mMRC) prema GOLD stadijumima



#### 4.3.2. Ispitivanje pokazatelja plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema broju egzacerbacija

Bolesnici su prema broju egzacerbacija podeljeni u dve grupe, u prvoj grupi je bilo 41 bolesnika sa < 2 egzacerbacije, a u drugoj 57 bolesnika sa  $\geq 2$  egzacerbacije, tabela 24. FEV1/FVC, FEV1, FEV1L, PEF, MEF 20 i 50 su bili statistički značajno viši u grupi pacijenata sa manjim brojem egzacerbacija. Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima FVC % i FVC (L) između dve grupe. Saturacija kisenonika je bila statistička značajno viša kod bolesnika manjim brojem egzacerbacija. Nije bilo statistički značajne razlike u minimalnoj srčanoj frekvenci između dve grupe. Parametri difuzijskog kapaciteta za CO, DLCO i KCO du bili statistički značajno viši kod bolesnika sa manjim brojem egzacerbacija. Parametri telesne pletizmografije: TLC, ITGV, ITGVL, RV, RVL su bili statistički značajno viši u grupi bolesnika sa većim brojem egzacerbacija. Parametri VC, VCL, ERV i ERVL se nisu statistički značajno razlikovali između grupa. Parametri TLC%RV RTOT

su bili statistički značajno viši u grupi pacijenata sa većim brojem egzacerbacija. IC i ICI se nisu statistički značajno razlikovali između grupa.

Tabela 24. Parametri plućne funkcije prema broju egzacerbacija

	Egzacerbacije <2 N=41	egzacerbacije ≥2 N=57	p
Spirometrija			
FEV1/FVC	48.7 ± 13	40.2 ± 11.1	0.001
FVC	87.2 ± 18.8	84.4 ± 19.9	0.483
RVCL	3 ± 0.9	2.8 ± 1	0.309
FEV1	53.9 ± 20.8	42.1 ± 15.3	0.003
FEV1/L	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.5	0.004
PEF	61.5 ± 22.7	48.7 ± 18.4	0.003
MEF 50%	16.0 (17.5)	10.0 (7.3)	0.004
MEF25 %	17.0 (13.0)	12.5 (11.0)	0.007
Pulsna oksimetrija			
SAT	95.2 ± 2.6	93.2 ± 3.6	0.003
SFMIN	79.4 ± 9.1	83.4 ± 13.5	0.080
Difuzijski kapacitet za CO			
DLCO	57.2 ± 21.1	45.1 ± 21	0.006
KCO	68.7 ± 22.8	54.9 ± 23.5	0.005
Telesna pletizmografija			
TLC	119 ± 19.2	130.2 ± 25.4	0.021
TLCL	7.1 ± 1.2	7.5 ± 1.8	0.211
ITGV	150.4 ± 32.6	178.5 ± 48.7	0.002
ITGVL	4.8 ± 1.1	5.6 ± 1.6	0.011
RV	174.9 ± 55.3	209 ± 65.5	0.009
RVL	3.8 ± 1	4.5 ± 1.4	0.004
VC	93.5 ± 16.7	89.7 ± 21.4	0.358
VCL	3.3 ± 0.8	3 ± 1.1	0.189
ERV %	94.0 (71.0)	113.5 (58.5)	0.160
ERVL	1 ± 0.6	1.1 ± 0.5	0.511
TLC%RV	138.7 ± 29.6	152 ± 25.9	0.021
RTOT	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.010

RTOT	159.6 ± 73.1	208.3 ± 106	0.014
IC	89.2 ± 24.1	82.2 ± 33.6	0.265
ICI	2.3 ± 0.6	2 ± 0.8	0.111

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± sd, a testirani Studentovim T testom za nezavisne uzorke; ¥ podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg) a testirani Mann-Whitney U testom

Ispitivani su parametri inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema broju egzacerbacija, rezultati su prikazani u tabeli 25. Vrednosti leukocita i apsolutni broj neutrofila su bili statistički značajno viši u grupi pacijenata sa većim brojem egzacerbacija, grafik 29-30. Vrednosti limfocita, eozinofila (apsolutne i procentulane) se nisu statistički značajno razlikovale između grupa. CRP je bio viši u grupi pacijenata sa većim brojem egzacerbacija, statistička značajnost je bila blizu konvencionalnog nivoa. Vrednosti MMP9, TIMP i MMP9/TIMP su bile više u grupi pacijenata sa većim brojem egzacerbacija, ali nije bilo statistički značajne razlike između grupa.

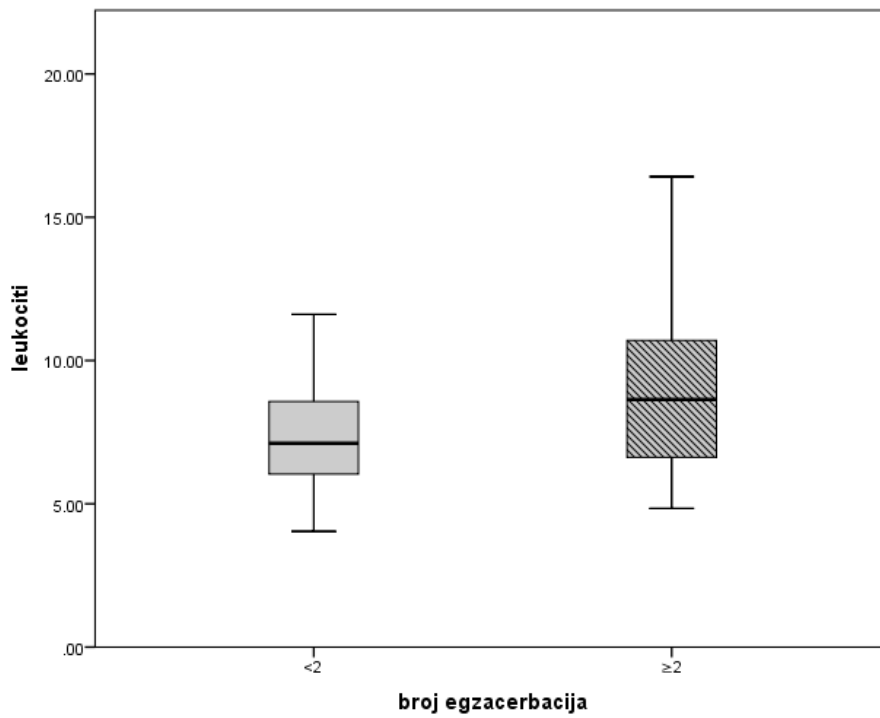
Tabela 25. Parametri inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema broju egzacerbacija

	Egzacerbacije <2 N=41	egzacerbacije ≥2 N=57	p
leukociti	7.4 ± 1.9	9.1 ± 2.9	0.001
neutrofili %	60.2 ± 14.4	63.9 ± 9.6	0.137
limfociti %	27.5 ± 9.5	24.9 ± 8.3	0.160
eozinofili %	2.1 ± 1.5	2.5 ± 1.7	0.334
neutrofili1	4.7 ± 1.7	5.9 ± 2.5	0.006
limfociti1	2 ± 0.7	2.2 ± 0.9	0.242
eozinofili1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.198
CRP ¥	2.1 (3.6)	4.1 (6.4)	0.087
MMP9 ¥	761.5 (724.8)	892.3 (681.9)	0.196
TIMP1	238 ± 50.9	244.9 ± 66.7	0.630
mmpTIMP ¥	3.1 (3.1)	3.5 (3.2)	0.222

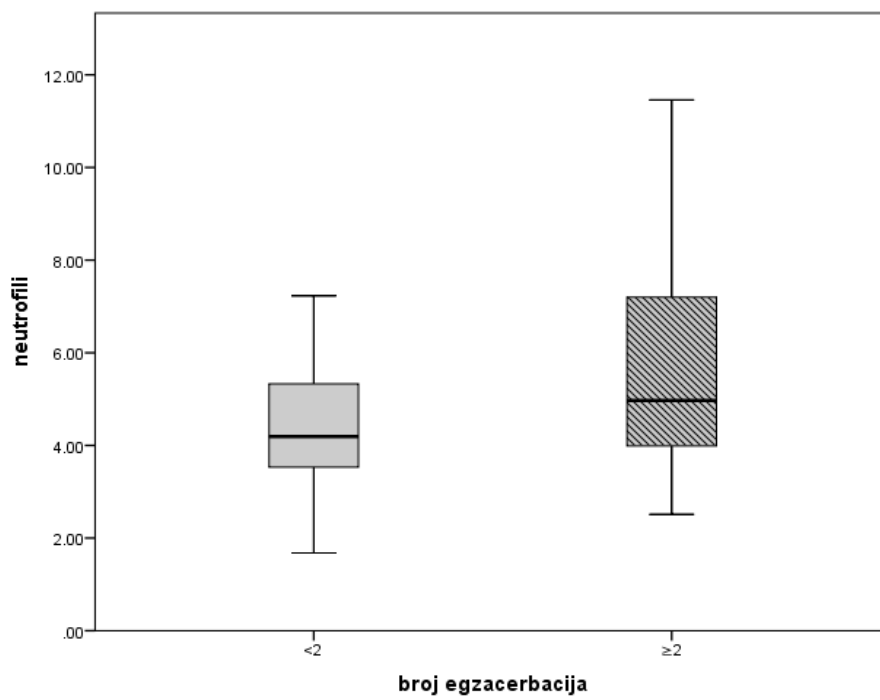
Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± sd, a testirani Studentovim T testom za nezavisne uzorke; ¥ podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg) a testirani Mann-Whitney U testom



Grafik 29. Vrednosti leukocita prema broju egzacerbacija



Grafik 30. Vrednosti neutrofila prema broju egzacerbacija

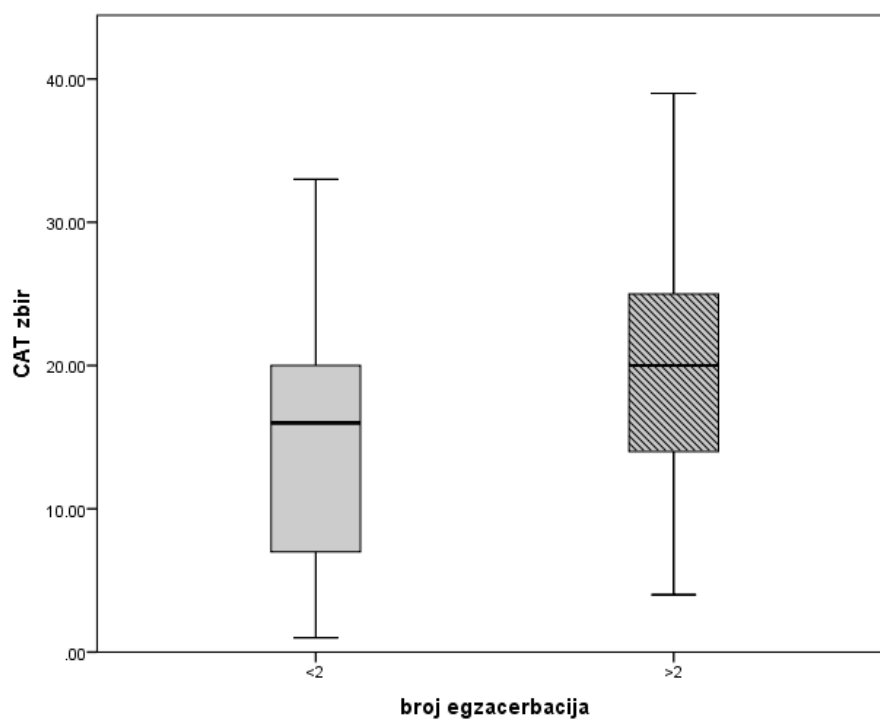


Ispitivani su obim simptoma (CAT upitnik) i intenzitet dispneje (MMRC skala dispneje) prema broju egzacerbacija, rezultati su prikazani u tabeli 26. Postojala je statistički značajna razlika u skorovima, pacijenti sa većim brojem egzacerbacija su imali više CAT i MMRC skorove, grafik 31-32.

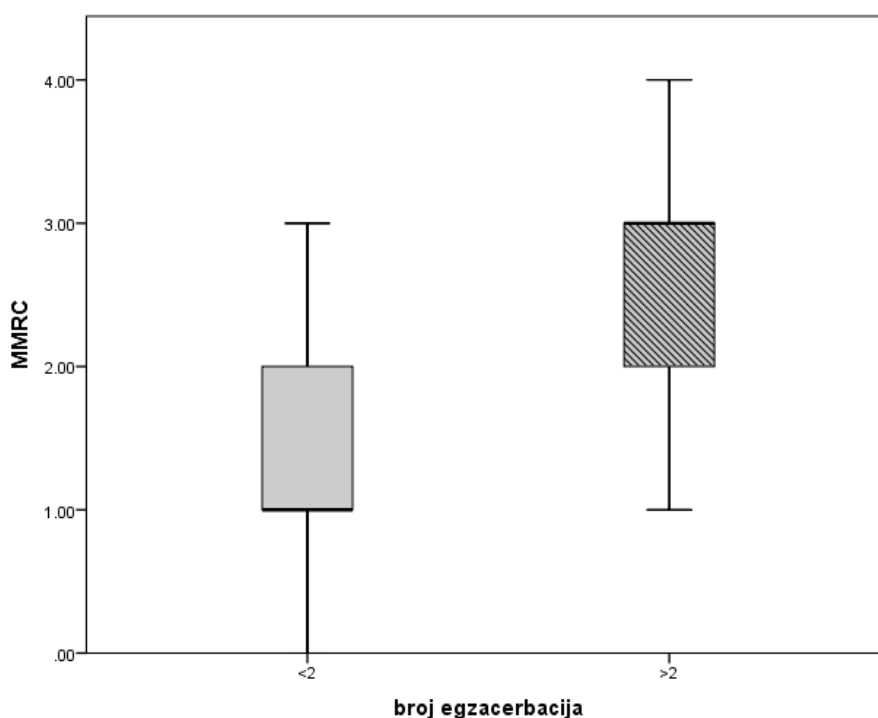
Tabela 26. CAT i MMRC zbir prema broju egzacerbacija

	Egzacerbacije <2 N=41	egzacerbacije ≥2 N=57	p
zbir	16 (7-20)	20 (14-25)	0.007
MMRC	1 (1-2)	3 (2-3)	<0.001

Grafik 31. CAT zbir prema broju egzacerbacija



Grafik 32. Intenzitet dispneje (MMRC) prema broju egzacerbacija



#### 4.3.3. Ispitivanje pokazatelja plućne funkcije, inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema CAT skor

Bolesnici su prema CAT skor

u dve grupe, u prvoj grupi je bilo 21 bolesnika sa CAT skorom  $< 10$ , manje simptoma, a u drugoj 77 bolesnika sa  $CAT \geq 10$ , više simptoma tabela x. FEV1/FVC, FEV1, FEV1 (L) , FVC(L) PEF, MEF 25 i 50 su bili statistički značajno viši u grupi pacijenata sa  $CAT < 10$ . Nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima FVC (%) između dve grupe. Saturacija kiseonika je bila statistička značajno viša kod bolesnika  $CAT < 10$ . Nije bilo statistički značajne razlike u minimalnoj srčanoj frekvenci između dve grupe. Parametri difuzijskog kapaciteta za CO, DLCO i KCO su bili statistički značajno viši kod bolesnika sa  $CAT < 10$ . Parametri telesne pletizmografije: RV%TLC, RTOT, RTOT (L) su bili statistički značajno viši u grupi bolesnika sa  $CAT \geq 10$ . Parametri telesne pletizmografije: TLC, ITGV, ITGVL, i VC (L) su bili viši u grupi bolesnika sa  $CAT \geq 10$ , razlika je bila blizu konvecnionalnog nivoa statističke značajnosti.

Parametri TLC (L) , RV, VC (%), IC i ICI se nisu statistički značajno razlikovali između grupa.

Tabela 27. Parametri plućne funkcije prema CAT skoru

	CAT<10 N=21	CAT ≥10 N=77	p
Spirometrija			
FEV1/FVC	50.6 ± 14.8	41.9 ± 11.3	0.004
FVC (%)	89.1 ± 16.4	84.7 ± 20.1	0.356
FVC (L)	3.2 ± 0.8	2.8 ± 1	0.036
FEV1 (%)	57.3 ± 22.1	44.2 ± 16.7	0.004
FEV1 (L) *	1.7 ± 0.9	1.1 ± 0.5	<0.001
PEF	64.2 ± 26.2	51.3 ± 18.8	0.012
MEF 50 *¥	22.0 (21.0)	11.0 (9.0)	0.003
MEF 25 *¥	19.5 (13.0)	14.0 (11.0)	0.002
Pulsna oksimetrija			
SATURACIJA O2 (%)*	95.5 ± 2.3	93.6 ± 3.5	0.027
S.FREKVENCA (OTKCAJ/MIN) *	78.8 ± 10.1	82.6 ± 12.4	0.204
Difuzijski kapacitet za CO			
DLCO	60 ± 21.5	47.4 ± 21.2	0.018
KCO	70.6 ± 24.1	57.9 ± 23.5	0.033
Telesna pletizmografija			
TLC (%)*	116.8 ± 24	128 ± 23	0.055
TLC (L) *	7.2 ± 1.1	7.3 ± 1.7	0.808
ITGV (%)*	150.8 ± 48	171.2 ± 43	0.064
ITGV (L) *	4.9 ± 1.3	5.3 ± 1.5	0.064
RV(%)*	170.5 ± 66.3	201.5 ± 61.3	0.248
RV (L)	3.8 ± 1.2	4.4 ± 1.3	0.047
VC (%)*	92.6 ± 14.8	90.9 ± 20.7	0.729

VC (L)	3.5 ± 0.7	3 ± 1	0.061
ERV (%) *¥	96.0 (72.8)	112.0 (68.0)	0.790
ERV (L) *	1.1 ± 0.7	1 ± 0.5	0.373
RV%TLC *	134.6 ± 27	149.7 ± 27.7	0.029
Rtot	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.040
Rtot (%)	147 ± 87.1	199.4 ± 96	0.027
IC	85.3 ± 23.2	85.1 ± 31.8	0.981
ICI	2.3 ± 0.6	2.1 ± 0.8	0.158

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± sd, a testirani Studentovim T testom za nezavisne uzorke; ¥ podaci su prikazani kao medijana (interkvartilni opseg) a testirani Mann-Whitney U testom

Ispitivani su parametri inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema CAT zbiru, rezultati su prikazani u tabeli 28. Nije bilo statistički značajne razlike u inflamatornim parametrima između grupa, Vrednosti MMP-9, TIMP-1 i MMP-9/TIMP-1 se nisu statistički značajno razlikovale između grupa.

Tabela 28. Parametri inflamacije i sistema proteaza/antiproteza prema CAT skoru

	CAT < 10 N=21	CAT ≥ 10 N=77	p
leukociti	7.7 ± 1.7	8.6 ± 2.8	0.185
neutrofili %	61.8 ± 6.8	62.5 ± 13	0.795
limfociti l	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.9	0.450
neutrofili l	4.8 ± 1.4	5.6 ± 2.4	0.186
eozinofili %	2.2 ± 1.6	2.4 ± 1.7	0.747
eozinofili l	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.349
CRP	4.7 (4.1)	3.5 (6.7)	0.816
MMP9	795.4 (591.0)	880.0 (733.5)	0.448
TIMP1	261 ± 70.7	237.3 ± 57.7	0.157
mmpTIMP	2.6 (2.5)	3.5 (3.3)	0.126

## 5. DISKUSIJA

U istraživanju je bilo uključeno 98 pacijenata sa HOBP prosečne starosti  $63.4 \pm 4.3$  i 47 pacijenata u kontrolnoj grupi prosečne starosti  $61.7 \pm 4.3$ . HOBP ispitanici su bili neznatno stariji od kontrole. Nije bilo statistički značajne razlike u starosti ispitanika između grupa ( $p=0.123$ ), uz sličnu distribucija pacijenata prema polu ( $p=0.199$ ). HOBP karakteriše ubrzan pad FEV1 u skladu sa godinama [134]. Shodno pomenutom, očekivanja bi bila da će pacijenti sa težom HOBP biti i stariji, što nije slučaj u ovom istraživanju, ali ni u ECLIPSE studiji koja je jedna od najvećih studija koja se bavila identifikacijom potencijalnih podtipova HOBP, kao i definisanjem prediktivnih markera njihove progresije [132,133]. Takođe, u ovoj studiji, kao i u našoj, HOBP ispitanici su bili neznatno stariji od kontrole [132,133]. U našem istraživanju pacijenti sa HOBP u GOLD I i III su imali  $64.9 \pm 9.3$  godina, a u III i IV  $63.3 \pm 9.3$  godine.

Bolesnici su prosečno 7 godina imali HOBP, pušili su 30 paklo/godina, a prosečan broj egzacerbacija je bio 2. Najviše ispitanika je činilo grupu D (50%), grupu B (26,3%), grupu A (14,3%), grupu C (9,8%). Broj egzacerbacija se statistički značajno razlikovao između kategorija, sa najmanjim brojem u A (0 (1.0) a najvećim brojem egzacerbacija u D kategoriji 3.0 (1.0) ( $p < 0.001$ ). U našem istraživanju 41 bolesnika (40,2%) je imalo  $< 2$  egzacerbacije, a 57 bolesnika (55,9%)  $\geq 2$  egzacerbacije. Pomenuti rezultati su znatno viši u odnosu na nalaze POPE studije, koja je obuhvatila 3362 pacijenta sa HOBP iz 10 zemalja regiona Centralne i Istočne Evrope CEE (*engl.* Central and Eastern Europe), a imala je zadatak da proceni prevalenciju fenotipova COPD-a prema prethodno definisanim kriterijumima. U ovoj studiji fenotipovi koji su uključivali česte egzacerbatore činili oko 30% ispitanika, a ova razlika se možda može objasniti heterogenošću u broju egzacerbacija među zemljama, gde je Srbija bila u grupi zemalja sa većom grupom egzacerbatora [136]. U našem istraživanju FEV1 je bio statistički značajno viši u grupi pacijenata sa manjim brojem egzacerbacija. Učestalost egzacerbacija je paralelno rasla sa bronhopstrukcijom [133].

Oko 2/3 bolesnika je imao komorbiditete, a najčešći je kardiovaskularni komorbiditet. U grupi KVS komorbiditeta najučestalija je bila arterijska hipertenzija, potom koronarna bolest, aritmije i srčana insuficijencija. Nalazi naše studije su u skladu sa nalazima POPE studije, gde je takođe najučestaliji bio KV komorbiditet. U strukturi učestalosti pojedinačnih KV oboljenja u grupi KV komorbiditeta, kao i u našoj studiji, prednjačila je arterijska hipertenzija i koronarna bolest [136]. U studiji ECLIPSE gde je HOBP grupu ispitanika činilo 2164 klinički stabilnih pacijenata, KV komorbiditet je takođe bio najučestaliji [132]

Prosečna vrednost BMI u grupi pacijenata sa HOBP je bila  $26.6 \pm 5.4$  kg/m<sup>2</sup>/, što je takođe u skladu sa nalazima POPE studije gde je prosečni BMI bio  $27.2 \pm 5.7$  kg/m<sup>2</sup> i ECLIPSE studije BMI  $26.5 \pm 5.7$  kg/m<sup>2</sup> [132, 136], a najviše ispitanika u našoj studiji je bilo u grupi prekomerno uhranjeni 36,7% (klasifikacija WHO).

Ispitanici su imali tešku do umerenu bronhoopstrukciju (post-BD FEV<sub>1</sub>/FVC (%) ( $43.7 \pm 12.6$ ), a post-BD FEV<sub>1</sub> (%) ( $47 \pm 18.6$ ) ; FVC (%) ( $85.6 \pm 19.4$ ) umereno snižen difuzijski kapacitet DLCO ( $50.1 \pm 21.8$  %) i hiperinflaciju TLC (%) ( $125.5 \pm 23.5$ ), RV (%) ( $194.6 \pm 63.4$ ), RV%TLC ( $146.4 \pm 28.$ ), VC (%) ( $91.3 \pm 19.5$ ), IC (%) ( $85.1 \pm 30$ ) uz povišene otpore u disjanim putevima R tot ( $0.6 \pm 0.3$ ). Sprometrijski pokazatelji takođe ukazuju da su pacijenti naše studijske grupe i po funkcijskim karakteristikama slični proseku grupe iz POPE CEE : FEV<sub>1</sub> % ( $52.8 \pm 18.5$ ), FVC % ( $80.0 \pm 20.4$ ), FEV<sub>1</sub>/FVC ( $0.5 \pm 0.1$ ) [132], a u ECLIPSE FEV<sub>1</sub>% ( $48.3 \pm 15.8$ ) [136].

Medijana (interkvartilni opseg) mMRC skora (2.0 (2.0) i CAT zbira (18.5 (14.2) je ukazala na veći obim simptoma kod ispitanika i izraženiju dispneju. Rezultati naše studije odgovaraju proseku regiona CEE koji iznosi CAT zbir  $17.4 \pm 7.8$  i mMRC skor  $2.0 \pm 1.0$  [132] i mMRC u ECLIPSE ( $1.7 \pm 1.1$ ) [136].

Vrednosti MMP-9 (848.7 (718.3) vs (58.7 (47.6) kontrola, TIMP 1(234.7 (63.4) vs (82.3 (63.4) kontrola, kao i odnosa MMP9/TIMP1 (3.4 (3.1) vs (0.40 (0.25) su bile statistički značajno više u grupi pacijenata sa HOBP u poređenju sa zdravom kontrolom. Nalazi ove studije su u saglasnosti sa meta analizom *Li Y. et al.* koja je obuhvatila 20 studija sa ukupno 923 ispitanika sa HOBP i 641 zdravih kontrola. Rezultati ove meta analize su ukazali da su vrednosti serumskih MMP-9 i TIMP-1

bili viši nego kod zdravih kontrola [137]. Studija *Linder et al.* koja je obuhvatila 1542 ispitanika i gde su srednje vrednosti MMP 9 bile značajnije veće kod ispitanika sa HOBP, ali ne i vrednosti TIMP 1 i MMP9/TIMP 1 i značajno su korelirale sa produktivni kašljem i sniženjem FEV1 u odnosu na predviđen [138]. Nekoliko studije je ukazalo na povišene vrednosti MMP -9 u serumu pacijenata sa HOBP [139- 142].

U našem istraživanju je postojala značajna pozitivna povezanost vrednosti leukocita i neutrofila (# i %) sa vrednostima MMP-9 i TIMP1 i MMP9/TIMP 1. U nekoliko istraživanja dobijeni su slični rezultati povezanosti MMP-9 sa neutrofilijom i sniženom plućnom funkcijom [143- 145].

U našem istraživanju je postojala negativna statistički značajna povezanost između MMP-9 i spirometrijskih pokazatelja FEV1/FVC ( $r = -0.308$ ,  $p = 0.005$ ), FVC % predviđenog ( $r = -0.294$ ,  $p = 0.008$ ) i FEV 1 % predviđenog ( $r = -0.367$ ,  $p = 0.001$ ). Slični rezultati su prikazani u nekoliko studija koje su tretirale i odnos serumskog MMP-9 i spirometrijskih pokazatelja gde je koncentracija serumske MMP-9 bila u negativnoj korelaciji sa FEV1% i odnosom FEV1/FVC %, odnosno sa porastom MMP-9 i odnosa MMP-9/TIMP-1 rastao je i stepen bronhoopstrukcije [146- 150].

Istraživanjem nivoa MMP-9 i TIMP-1 i MMP-9/TIMP-1 u sputumu u nekoliko studija su uočene povišene vrednosti u odnosu na kontrolu koje su negativno korelirale sa FEV1 [146,147]. Studije na matriks metaloproteinazama u BALu su pokazale povezanost sa destrukcijom parenhima i sniženjem plućne funkcije kod pacijenta sa subkliničkim i dijagnostikovanim emfizemom [149], a u studiji *Vlahos et al.* pokazana je značajna up regulacija MMP-9 u BAL uz korelaciju sa stepenom težine oboljenja [150].

U istraživanju *Ólafsdottir et al.* MMP-9, TIMP 1 i MMP-9/TIMP1 su korelirale sa FEV 1 i to niže vrednosti FEV1 bile su povezane sa višim serumskim nivoima MMP-9 ( $P = 0,001$ ) i TIMP-1 ( $P < 0,001$ ) i većim vrednostima odnosa MMP-9 /TIMP-1 ( $P = 0,02$ ) [151]. U našem istraživanju je takođe postojala negativna statistički značajna povezanost između MMP-9 i FEV1 ( $r = -0.367$ ,  $p = 0.001$ ) i odnosa MMP-9/TIMP 1 i FEV1 ( $r = -0.392$ ,  $p < 0.001$ ), ali ne i TIMP 1 koji nije bio statistički značajno povezan sa parametrima spirometrije. Moguće objašnjenje bi



moglo da se odnosi na podatak da su u pomenutoj studiji učestvovali ispitanici starije životne dobi ( populacioni uzorak od 888 ispitanika starijih od 70 godina), i podatak iz nekoliko studija da je TIMP 1 povezan sa životnom dobi [151-153].

Rezultati našeg istraživanja, koji su saglasni i sa prethodno navedenim istraživanjima u ovoj oblasti, ukazuju na udruženost MMP-9 i stepena oštećenja plućne funkcije, procenjenog na osnovu FEV1, kod pacijenta sa HOBP. Pomenuto sugeriše da je MMP-9 povezana sa stepenom težine oboljenja i da potencijalno može biti značajna u procesu nastanka bronhopneumonije, remodelovanju disajnih puteva i razvoju HOBP. Odnos MMP-9/TIMP 1 je u negativnoj korelaciji sa FEV1, što ukazuje da sa većim oštećenjem FEV1 raste i pomenuti odnos, i sugeriše na disbalans u odnosu proteaza/antiproteaza u korist proteolitičkih aktivnosti. Pomenuto takođe može ukazivati na potencijalni značaj u patofiziologiji nastanka i razvoja HOBP.

Ispitivanja matriks-metaloproteinaza su obavljena i na tkivu [154], a IHH analizom HOBP pluća i kontrola uočen značajan porast ekspresije MMP-2 i MMP-9, kao i da su neutrofili glavne ćelije koje pokazuju pozitivni signal za MMP-9, što može doprineti patogenezi HOBP [155].

U našoj studiji smo procenjivali i povezanost pokazatelja difuzijskog kapaciteta sa serumskim vrednostima MMP-9, TIMP 1 i MMP-9/TIMP 1. Difuzijski kapacitet za ugljenmonoksid CO je tradicionalna fiziološka mera i smatra se korisnom u proceni stepena težine emfizema [161]. Pokazatelji difuzijskog kapaciteta za CO u našoj studiji su bili statistički značajno viši (DLCO % p <0.001 ) kod bolesnika sa nižim GOLD stadijumom I i II (DLCO %  $61.7 \pm 20.1$ ) u odnosu na GOLD III i IV (DLCO %  $42.2 \pm 19.3$ ). Rezultati sugerišu da su pacijenti sa težom HOBP i višim GOLD stadijumom imali i veće oštećenje difuzijskog kapaciteta, što ukazuje na emfizem. Ipak, u istraživanju nismo dokazali statistički značajnu povezanosti MMP-9, TIMP 1 i MMP-9/TIMP 1 sa vrednostima pokazatelja difuzijskog kapaciteta za ugljenmonoksid (CO). Slični rezultati bili su u studiji *Beeh K.M. et al.* gde su ispitivane vrednosti MMP9 i TIMP-1 ali ne u serumu, već u sputumu, i uočene su povišene vrednosti kod pacijenata sa HOBP [154]. Takođe su

koncentracije MMP-9 negativno korelirale sa bronhoopstrukcijom ( $FEV_1\%FVC$ ) ali ne i sa difuzijskim kapacitetom i vitalnim kapacitetom .

Nekoliko studija koje su se bavile odnosom MMP-9 i TIMP 1 kod pacijenta sa emfizemom, su imale slične rezultate, ali su se bazirale na karakteristikama emfizema prema pokazateljima kompjuterizovane tomografije grudnog koša, ali ne i funkcijskim karakteristikama. U studiji *D'Armiento JM et al.* u bronhoalveolarnom lavatu (BAL) i u plazmi ispitanika sa emfizemom (emfizem procenjen kompjuterizovanm tomografijom), MMP i TIMP-1 nisu korelirali sa važnim parametrima bolesti i nisu imali prediktivnu vrednost za sledstveno oštećenje plućne funkcije, iako su bili veći u grupi sa emfizemom [162]. U studiji *Koo et al.* iako je postojala pozitivna korelcija između indeksa emfizema procenjenog kompjuterizovanom tomografijom i stepena težine emfizema, sa nivoima MMP-8 i MMP-9, bila je neovisna od plućne funkcije [163]. U studiji *Barjaktarević et al.* podaci su podržali hipotezu da najveći uticaj na DLCO ima plućni kapilarni volumen krvi, obzirom da je najveća korelacija sa DLCO bila inverzna povezanost sa volumenom tkiva procenjenim QCT [164]. U studiji *Papakonstantinou et al.* MMP-9, TIMP-1 i TIMP-2 su bile značajno povišene u BAL-u tokom aktne egzacerbacije HOBP (AEHOBP), ali nijedna od MMP i TIMP nije bila u korelaciji sa DLCO% predviđenog [165].

U našoj studiji iako su vrednosti MMP-9 bile povećane, izostala je značajna korelacija sa DLCO % predviđenog kao korisnom merom u proceni stepena težine emfizema. Pomenuto bi moglo da implicira da su MMP-9 i TIMP-1 obzirom na negativnu korelaciju sa pokazateljima bronhoopstrukcije pre udružene sa remodelovanjem disajnih puteva koje vodi u bronhopstrukciju nego emfizemom. U prilog govori i studija *Kang MJ et al.* koja je pokazala da MMP-9 ekspresija u parenhimu humanog pluća je udružena sa pušenjem i bronhoopstrukcijom, ukazujući da MMP-9 može imati ulogu u patogenezi pušenjem izazavne bronhopstukcije i razvoja HOBP [159].

Značajan procenat pacijenata sa HOBP-om, ima redukovano elastično svojstvo pri izdahu koje u kombinaciji sa ograničenjem ekspiratornog protoka na kraju dovodi do hiperinflacije u plućima [96]. Pacijent sa HOBP mogu imati i statičku i

dinamsku hiperinflaciju tj. u miru i pri naporu. Sa bolešću i godinama oštećenje vezivnog tkiva sa posledičnim gubitkom elastičnih svojstava i padom elastičnog pritiska pri izdahu na nulu pri većim vrednostima FRC, rezultira sve većom hiperinflacijom [166]. Primarna determinišuća karakteristika hiperinflacije je povećanje TLC i konvencionalno se smatra da postoji kada je TLC preko 120% od predviđenog, a takođe i kompartmana EELV, RV ili RV/TLC iznad gornjih granica prirodne varijacije [97]. U daljem razvoju hiperinflacije od blage do umeren HOBP VC i IC se linearano smanjuju sa progresijom bronhopneumonije posmatrane kroz pad FEV1 [96]. U našoj studiji MMP-9 je pozitivno korelirala sa pokazateljima izmerenim telesnom plezizmografijom (TLC (L), ITGV (L), RV % predviđenog, RV (L), RV%TLC), i negativno sa VC% i IC % predviđenog). Rezultat ukazuje da je sa porastom hiperinflacije rasla i vrednost MMP-9, i sugerise značaj moguću elastolitičku i proteolitičku aktivnosti MMP i ulogu u razvoju hiperinflacije. Pokazatelji mereni telesnom plezizmografijom su bili pozitivno povezani sa vrednostima odnosa MMP-9/TIMP-1 (ITGV (%), ITGV (L), RV (%), RV (L), RV%TLC, a negativno VC (%) i IC (%)), što govori u prilog da je sa porastom hiperinflacije rastao i odnos MMP-9/TIMP-1. Iz pomenutog proizilazi da su pacijenti sa većim odnosom imali veću hiperinflaciju, odnosno izraženiji disbalans između proteaza /antiproteaza u korist proteolitičke komponente. TIMP-1 nije bio statistički značajno povezan sa parametrima telesne plezizmografije.

Ispitanici u stabilnoj fazi HOBP nisu imali povišene vrednosti pokazatelja inflamacije u serumu. Prosečne vrednosti pokazatelja inflamacije su bile u referentnom opsegu Ne % ( $62.4 \pm 11.9$ ), Eo % ( $2.3 \pm 1.7$ ), CRP (3.4 (6.2)). Više vrednosti CRP, leukocita i neutrofila su bile povezane sa višim vrednostima MMP-9 i TIMP-1. Odnos MMP-9/TIMP-1 je bio pozitivno statistički značajno povezan sa leukocitima i apsolutnim brojem neutrofila. U studiji *Piesiak P et al.* serumski MMP-9 i TIMP-1 je bio viši kod ispitanika sa HOBP nego kontrola [140], i bila je značajna korelacija sa CRP i FEV1 što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

U našoj studiji prosečne vrednosti pokazatelja inflamacije su bile u referentnom opsegu Ne % ( $62.4 \pm 11.9$ ), Eo % ( $2.3 \pm 1.7$ ), CRP (3.4 (6.2)). Nije bilo korelacije CRP i pokazatelja plućne funkcije. Više vrednosti CRP, leukocita i neutrofila su bile povezane sa višim vrednostima MMP-9 i TIMP-1. Postojala je značajna

pozitivna povezanost vrednosti leukocita i neutrofila (# i %) sa vrednostima MMP-9 i TIMP1 i MMP9/TIMP 1, pletizmografski izmerenim RV i ITGV- “zarobljavanjem vazduha (*engl.* air trapping)”. Dakle postojala je značajna koelacija između izmerenih serumskih pokazatelja inflamacije i pokazatelja sistema proteaza/antiproteaza. Postojala je značajna povezanost CRP, ali ne i matriksmetaloproteinaza sa BMI, što ukazuje da su sa porastom BMI rasle i vrednosti pokazatelja inflamacije.

CRP je snažan i nezavistan prediktor budućih ishoda HOBP kod subjektata sa bronhoopstrukcijom [167]. Više koncentracije CRP su udružene sa nižim nivoima FEV1, a koncentracija CRP je bila značajno udružena sa HOBP [168]. U kliničkim uzorcima veće koncentracije CRP su udružene sa HOBP [169]. Čini se da koncentracija CRP se smanjuje sa primenom inhalacionih kortikosteroida u stabilnoj HOBP [170]. U našoj studiji 67,3 % pacijenata je koristilo fiksnu kombinaciju ICS/LABA, što potencijalno može objasniti odsustvo povšenih vrednosti CRP. Više vrednosti CRP su bile udružene nižim vrednostima FEV1 u populacionim studijama [171,172]. Nekoliko studija koje su se bavile kardiovaskularnim bolestima su uočile udruženost između MMP-9 and CRP, kao deo zajedničkog inflamatornog procesa [173-175], što korelira sa nazima našeg istraživanja. U studiji *Sniteker et al.* su uočili da su cirkulišući MMP-9 nivoi pozitivno korelirali sa leukocitima, da su oba markera povišena a da se njihov odnos poboljšava shodno korelacionom koeficijentu pušača. Ovakav nalaz je značajan jer obezbeđuje epidemiološke dokaze koji podržavaju teoiju da su lekociti potencijalni izvor cirkulišuće MMP-9 *in vivo* i da pušenje ima uticaj na porast MMP-9 i leukocita[176]. Sistemski inflamatorni odgovor prikazan kroz vrednosti leukocita je značajno rastao sa porastom HOBP stadijuma. Pacijenti sa stadijumom GOLD IV su imali veće brojeve cirkulišućih inflamatornih ćelija u odnosu na zdrave kontrole i ispitanike sa GOLD stadijumom II i III [177]. Povišene vrednosti MMP-1, MMP-8 i MMP- 9 su bile u skladu sa GOLD stadijumom [178]. Pomenuti rezultati su bili u skladu sa našim istraživanjem gde su vrednosti MMP-9 i MMP-9/TIMP-1 su bile statistički značajno više u grupi pacijenata sa GOLD stadijumom 3 i 4. U studiji *Jarenbäck et al.* svi pokazatelji plućne funkcije , mereni telesnom pletizmografijom, CO difuzijom i impulsnom oscilometrijom su bili pod značajnim uticaje porasta GOLD stadijuma. Ispitanici u našoj studiji su takođe u višem GOLD

stadijumu (III i IV), imali veći stepen bronhoopstrukcije, hiperinflacije, oštećenja difuzije, obima simptoma, izraženiju dispneju uz disbalans u sistemu proteaza/antiproteaza sa predominacijom proteolitičke aktivnosti. Broj egzacerbacija je pozitivno, statistički značajno bio povezan sa GOLD stadijumom, tj. viši GOLD stadijum je bio udružen sa većim brojem egzacerbacija. Nije bilo statističke značajnosti u pokazateljima sistema proteza /antiproteaza između ispitanika podeljenih u dve grupe egzacerbatora i ne-egzacerbatora, i grupa sa manje i više simptoma definisanih CAT skorom. Ipak u našoj studiji pacijenti sa višim GOLD stadijumom (3 i 4) su imali veće CAT skorove. Slični rezultati su uočeni u Evropskoj studiji preseka gde je zapažen konstantni porast CAT zbira između HOBP stadijuma sa 3 poena razlike među stadijumima [179].

Pacijent sa HOBP imaju disbalans u sistemu proteaza/antiproteaza uz prevagu proteolitičke aktivnosti. U ovom istraživanju je ukazano da postoji povezanost između inflamacije i ravnoteže u sistemu proteaza/antiproteaza.. Takođe pokazatelji sistema proteaza/antiproteaza su značajno povezani sa glavnim karakteristikama HOBP, a to su bronhoopstrukcija i hiperinflacija. Rezultati upućuju na moguću ulogu MMP-9 u patofiziološkom procesu nastanka i razvoja HOBP. MMP-9 bi se mogla korisistiti kao eventualni biomarkera za nastanak i razvoj HOBP, ali su potrebna dodatna istraživanja.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Ispitanici sa HOBP su imali značajno veće vrednosti MMP- 9, TIMP-1 i odnosa MMP-9/TIMP-1 u poređenju sa zdravim ispitanicima, što ukazuje na disbalans u sistemu proteaza/antiproteaza, sa predominacijom proteolitičke aktivnosti.
2. Ispitanici u stabilnoj fazi HOBP nisu imali povišene vrednosti pokazatelja inflamacije u serumu, ali su više vrednosti CRP, leukocita i neutrofila bile povezane sa višim vrednostima MMP-9 i TIMP-1.
3. Nije bilo korelacije CRP i pokazatelja plućne funkcije.
4. Postojala je negativna statistički značajna povezanost između MMP-9 i odnosa MMP-9/TIMP-1 i stepena bronhopstrukcije.
5. Porastom MMP-9 i odnosa MMP-9/TIMP-1 rasli su pletizmografski izmereni pokazatelji hiperinflacije.
6. Vrednosti MMP-9, TIMP1 i MMP-9/TIMP-1 nisu bile značajno povezane sa izmerenim difuzijskim kapacitetom za CO.
7. Nije postojala povezanost TIMP- 1 sa pokazateljima plućne funkcije.
8. Viša vrednost CAT skora je bila povezana sa višim vrednostima MMP-9 i MMP-9/TIMP-1, ali ne i pokazateljima inflamacije.
9. Viša vrednost mMRC skora je bila povezana sa višim vrednostima MMP-9 i MMP-9/TIMP-1 i apsolutnim brojem neutrofila.
10. Ispitanici u višem GOLD stadijumu (III i IV), imali veći stepen bronhopstrukcije, hiperinflacije, oštećenja difuzije, obima simptoma, izraženiju dispneju uz disbalans u sistemu proteaza/antiproteaza sa predominacijom proteolitičke aktivnosti.
11. Ispitanici sa manje egzacerbacija imali manji stepen bronhopstrukcije i bolji difuzijski kapacitet. Česti egzacerbatori su imali veće otpore i statičke volumene-hiperinflaciju, veći obim simptoma, izraženiju dispneju, i vrednosti bele krvne loze.

Nije bilo statističke značajnosti u pokazateljima sistema proteaza /antiproteaza između dve grupe.

12. Pokazatelji inflamacije i sistema proteaza /antiproteaza se nisu statistički značajno razlikovale između grupa sa više i manje simptoma, a shodno izračunatom CAT zbiru.

## 6. LITERATURA

1. Davies Adeloye, Stephen Chua, Chinwei Lee, Catriona Basquill, Angeliki Papan, Evropi Theodoratou, Harish Nair, Danijela Gasevic, Devi Sridhar, Harry Campbell, Kit Yee Chan, Aziz Sheikh, Igor Rudan, and Global Health Epidemiology Reference Group (GHERG). Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis. *J Glob Health*. 2015 Dec; 5(2): 020415.
2. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2197–223.
3. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095–128.
4. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3(11): e442.
5. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2017. Available from: <http://goldcopd.org>.
6. de Marco R, Accordini S, Marcon A, Cerveri I, Antó JM, Gislason T, et al.; European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:891–897.



7. Mahler DA, Harver A, Lentine T, Scott JA, Beck K, Schwartzstein RM. Descriptors of breathlessness in cardiorespiratory diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1357–1363.
8. O'Donnell DE, Bertley JC, Chau LKL, Webb KA. Qualitative aspects of exertional breathlessness in chronic airflow limitation: pathophysiologic mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:109–115.
9. Sanders KJC, Kneppers AEM, van de Boel C, Langen RCJ, Schols AMWJ. Cachexia in chronic obstructive pulmonary disease: new insights and therapeutic perspective. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2016;7(1):5-22.
10. Wüst RC, Degens H. Factors contributing to muscle wasting and dysfunction in COPD patients. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2007;2(3):289-300.
11. Yohannes AM, Alexopoulos GS. Depression and anxiety in patients with COPD. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*. 2014;23(133):345-349.
12. Janssen DJA, Wouters EFM, Parra YL, Stakenborg K, Franssen FME. Prevalence of thoracic pain in patients with chronic obstructive pulmonary disease and relationship with patient characteristics: a cross-sectional observational study. *BMC Pulmonary Medicine*. 2016;16:47.

13. Cavallès A., Brinchault-Rabin G, Dixmier A., Goupil F., Gut-Gobert C., Marchand-Adam S., Meurice JC, Morel H., Person-Tacne Ct, Leroyer C, Diot P. Comorbidities of COPD. *European Respiratory Review* 2013 22: 454-475.
14. Marc Miravittles, Myriam Calle, Juan José Soler-Cataluña. Clinical Phenotypes of COPD: Identification, Definition and Implications for Guidelines. *Arch Bronconeumol* 2012;48:86-98.
15. P.G. Gibson, J.L. Simpson. The overlap syndrome of asthma and COPD: what are its features and how important is it? *Thorax*, 64 (2009), pp. 728-735.
16. Shapiro SD. End-stage chronic obstructive pulmonary disease: the cigarette is burned out but inflammation rages on. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:339–340.
17. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M, et al. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2011;365:1567–75.
18. Hogg JC, McDonough JE, Suzuki M. Small Airway Obstruction in COPD: New Insights Based on Micro-CT Imaging and MRI Imaging. *Chest*. 2013;143(5):1436-1443.
19. Hogg JC. A brief review of chronic obstructive pulmonary disease. *Canadian Respiratory Journal: Journal of the Canadian Thoracic Society*. 2012;19(6):381-384.

20. Mullen JBM, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Reassessment of inflammation of airways in chronic bronchitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;291:1235-1239.
21. Saetta M, Turato G, Facchini FM, et al. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1633-1639.
22. Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV<sub>1</sub> decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1530–1535.
23. Vestbo J. Epidemiological studies in mucus hypersecretion. *Novartis Found Symp* 2002;248:3–12.
24. Kim WD, Eidelman DH, Izquierdo JL, Ghezzo H, Saetta MP, Cosio MG. Centrilobular and panlobular emphysema in smokers. Two distinct morphologic and functional entities. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:1385–1390.
25. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004;364:709–721.
26. Chu FSF, Utokaparch S, Butazu L, et al. The nature of airway obstruction in COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:A874.
27. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645-2653.
28. Dickson RP, Erb-Downward JR, Martinez FJ, Huffnagle GB. *The Microbiome and the Respiratory Tract. Annu Rev Physiol*. 2016;78:481–504.

29. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, et al.: Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PloS one* 2011, 6(2):e16384.
30. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, Flores SC, Fontenot AP, Ghedin E, Huang L, Jablonski K, Kleeerup E, Lynch SV, Sodergren E, Twigg H, Young VB, Bassis CM, Venkataraman A, Schmidt TM, Weinstock GM, Lung HIVMP. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:1067–1075.
31. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, Beck JM, Curtis JL, Huffnagle GB. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio*. 2015;6:e00037.
32. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV, Cooper J, Sin DD, Mohn WW, Hogg JC. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:1073–1080.
33. Mortaz E, I, Adcock M, Ricciardolo FL, Varahram M, Jamaati H, Velayati AA, Folkerts G, Garssen J. Anti-Inflammatory Effects of *Lactobacillus Rahmnosus* and *Bifidobacterium Breve* on Cigarette Smoke Activated Human Macrophages. *PLoS One*. 2015;10:e0136455.
34. Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K (2014) The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *Eur Respir Rev* 23:350–355.

35. Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L et al (1998) Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol* 274:L908–L913.
36. James C Hogg. A brief review of chronic obstructive pulmonary disease. *Can Respir J*. 2012 Nov-Dec; 19(6): 381–384.
37. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012;18:1028-40.
38. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003 Oct;22(4):672-88.
39. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723–737.
40. Pieter S. Hiemstra Altered Macrophage Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc*, Dec 2013 Vol 10, Supplement, pp S180–S185.
41. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:602–609.
42. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, Kilty I, Rahman I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L46–L57.

43. Teresa D. Tetley. Macrophages and the Pathogenesis of COPD. *Chest* 2002;Volume 121, Issue 5, Supplement, Pages 156S–159S.
44. Berenson CS, Garlipp MA, Grove LJ, Maloney J, Sethi S. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 2006;194:1375–1384.
45. MartíLlitas P, Regueiro V, Morey P, Hood DW, Saus C, Sauleda J, Agustí AG, Bengoechea JA, Garmendia J. Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun* 2009;77:4232–4242.
46. 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.
47. Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;37:748–755.
48. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, *et al.* Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005;352:1967–1976.
49. Stănescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax* 1996;51:267–271.

50. O'Donnell RA, Peebles C, Ward JA, Daraker A, Angco G, Broberg P, Pierrou S, Lund J, Holgate ST, Davies DE, *et al.* Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD. *Thorax* 2004;59:837–842.
51. Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J* 2001;17:1112–1119.
52. Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:631–638.
53. Hoenderdos, K, Condliffe, A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48:531–9.
54. Sengeløv H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 1993;150:1535–1543.
55. Cadwallader KA, Uddin M, Condliffe AM, Cowburn AS, White JF, Skepper J N, Ktistakis NT, Chilvers ER. Effect of priming on activation and localization of phospholipase D-1 in human neutrophils. *Eur J Biochem* 2004;271:2755–2764.
56. McGovern NN, Cowburn AS, Porter L, Walmsley SR, Summers C, Thompson AA, Anwar S, Willcocks LC, Whyte MK, Condliffe AM, Chilvers ER. Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and killing of *Staphylococcus aureus* in human neutrophils. *J Immunol* 2011;186:453–463.
57. Koenderman L, Kanters D, Maesen B, Raaijmakers J, Lammers JW, de Kruif J, Logtenberg T. Monitoring of neutrophil priming in whole blood by antibodies isolated from a synthetic phage antibody library. *J Leukoc Biol* 2000;68:58.

58. Oudijk EJD, Gerritsen WB, Nijhuis EH, Kanters D, Maesen BL, Lammers JW, Koenderman L. Expression of priming-associated cellular markers on neutrophils during an exacerbation of COPD. *Respir Med* 2006;100:1791–1799.
59. Faurschou M, Sørensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta* 2002;1591:29–35.
60. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985;64:111–126.
61. Nakayama T, Church DF, Pryor WA. Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Free Radic Biol Med* 1989;7:9–15.
62. Heinecke JW. Tyrosyl radical production by myeloperoxidase: a phagocyte pathway for lipid peroxidation and dityrosine cross-linking of proteins. *Toxicology* 2002;177:11–22.
63. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997;89:3503–3521.
64. Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* 1995;131:775–789.



65. Hannah S, Mecklenburgh K, Rahman I, Bellingan GJ, Greening A, Haslett C, Chilvers ER. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett* 1995;372:233–237.
66. Nikoletta Rovina, Antonia Koutsoukou, and Nikolaos G. Koulouris, “Inflammation and Immune Response in COPD: Where Do We Stand?,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, Article ID 413735, 9 pages, 2013.
67. M. G. Cosio, M. Saetta, and A. Agusti, “Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 23, pp. 2396–2454, 2009.
68. M. Saetta, A. di Stefano, G. Turato et al., “CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease,” *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 157, no. 3, pp. 822–826, 1998.
69. W. D. Kim, H. S. Chi, K. H. Choe et al., “A possible role for CD8+ and non-CD8+ cell granzyme B in early small airway wall remodelling in centrilobular emphysema,” *Respirology*, vol. 18, no. 4, pp. 688–696, 2013.
70. R. A. Urbanowicz, J. R. Lamb, I. Todd, J. M. Corne, and L. C. Fairclough, “Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients,” *Respiratory Research*, vol. 11, article 76, 2010.
71. A. di Stefano, G. Caramori, I. Gnemmi et al., “T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 157, no. 2, pp. 316–324, 2009.

72. P. Miossec, T. Korn, and V. K. Kuchroo, "Interleukin-17 and type 17 helper T cells," *The New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 9, pp. 848–898, 2009.
73. G. G. Brusselle, T. Demoor, K. R. Bracke, C.-A. Brandsma, and W. Timens, "Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful?" *The European Respiratory Journal*, vol. 34, no. 1, pp. 219–230, 2009.
74. B. W. A. van der Strate, D. S. Postma, C.-A. Brandsma et al., "Cigarette smoke-induced emphysema: a role for the B cell?" *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 173, no. 7, pp. 751–758, 2006.
75. E. Litsiou, M. Semitekolou, I. E. Galani et al., "CXCL13 production in B cells via Toll-like receptor/lymphotoxin receptor signaling is involved in lymphoid neogenesis in chronic obstructive pulmonary disease," *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 187, no. 11, pp. 1194–1202, 2013.
76. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009; **135**: 505–512.
77. Gao, W., Li, L., Wang, Y., Zhang, S., Adcock, I. M., Barnes, P. J., Huang, M. and Yao, X. (2015), Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?. *Respirology*, 20: 722–729.
78. Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, Dang DT, Teater M, Strulovici-Barel Y, Salit J, Harvey BG, Crystal RG. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68: 877–892.

79. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; **378**: 1015–1026.
80. Robbins, CS, Franco, F, Mouded, M et al. Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice. *J Immunol.* 2008; 180: 6623–6628
81. D'hulst, AI, Vermaelen, KY, Brusselle, GG et al. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J.* 2005; 26: 204–213.
82. Robbins, CS, Dawe, DE, Goncharova, SI et al. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30: 202–211.
83. Geert R Van Pottelberge, Ken R Bracke, Ingel K Demedts, Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respiratory Research*, 2010, Volume 11, Number 1, Page 1.
84. Tsoumakidou Maria et al. Decreased Small Airway and Alveolar CD83+ Dendritic Cells in COPD. *CHEST*, Volume 136, Issue 3, 726 – 733.
85. Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, et al. Sputum eosinophilia and the short term response to inhaled mometasone in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2005;60(3):193–8.
86. Siddiqui SH, Guasconi A, Vestbo J, et al. Blood eosinophils: a biomarker of response to extrafine beclomethasone/formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(4):523–5.

87. Singh D, Kolsum U, Brightling CE, Locantore N, Agusti A, Tal-Singer R. Eosinophilic inflammation in COPD: prevalence and clinical characteristics. *Eur Respir J*. 2014;44(6):1697–700.
88. Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Blood Eosinophils and Exacerbations in COPD: the Copenhagen General Population Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015
89. Siva R, Green RH, Brightling CE, Shelley M, Hargadon B, McKenna S. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD a randomised controlled trial. *Eur Respir J*. 2007;29(5):906–913.
90. Sabith R, Thomas P, Shale DJ, Collins P, Linnane SJ. The effects of hypoxia on markers of coagulation and systemic inflammation in patients with COPD. *Chest* 2010;138(1):47-51.
91. Funda Aksu, Nermin Capan, Kurtulus Aksu, Ruhsar Ofluoglu, Sema Canbakan, Bunyamin Yavuz and Kadir Okhan Akin. C reactive protein levels are raised in stable Chronic obstructive pulmonary disease patients independent of smoking behaviour and biomass exposure. *J Thorac Dis* 2013 Aug; 5(4):414-421.
92. Johannes MA Daniels, Marianne Schoorl , Dominic Snijders, Dirk L. Knol, René Lutter, Henk M. Jansen, Wim G. Boersma. Procalcitonin versus C-reactive protein as predictive markers of response to antibiotic therapy in acute exacerbations of COPD. *CHEST* 2010; 138(5):1108-15.
93. Stolz D, Kostikas K, Blasi F, Boersma W, Milenkovic B, Lacoma A, Louis R, Aerts KG, Welte T, Torres A, Rohde G, Boeck L, Rakic J, Scherr A, Hertel S, Giersdorf S, Tamm M. Adrenomedullin refines mortality prediction by the BODE index in COPD: the “BODE-A” index. *Eur Respir J* 2014;43:397-408.

94. Thomas Glaab, Claus Vogelmeier, and Roland Buhl. Outcome measures in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): strengths and limitations. *Respir Res.* 2010; 11(1): 79.
95. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, Brusasco V, Burge PS, Calverley PMA, Celli BR, Jones PW, Mahler DA, Make B, Miravittles M, Page CP, Palange P, Parr D, Pistolesi M, Rennard SI, Rutten-van Mölken MP, Stockley R, Sullivan SD, Wedzicha JA, Wouters EF. American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on outcomes of COPD. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J* 2008; 31:416–469.
96. Gagnon P, Guenette JA, Langer D, et al. Pathogenesis of hyperinflation in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* 2014;9:187-201. doi:10.2147/COPD.S38934.
97. D. E. O'Donnell , P. Laveneziana. Physiology and consequences of lung hyperinflation in COPD. *Eur Respir Rev* December 1, 2006 vol. 15 no. 100 61-67.
98. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. ATS/ERS Task Force: Standardisation of lung function testing: Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26: 948–968.
99. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 6: Suppl. 16, 5–40.

100. Leith DE, Brown R. Human lung volumes and the mechanisms that set them. *Eur Respir J* 1999; 13: 468–472.
101. Tantucci C, Duguet A, Similowski T, Zelter M, Derenne JP, Milic-Emili J. Effect of salbutamol on dynamic hyperinflation in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur Respir J* 1998; 12: 799–804.
102. Casanova C, Cote C, de Torres JP, Aguirre-Jaime A, Marin JM, Pinto-Plata V, Celli BR: Inspiratory-to-total lung capacity predicts mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171:591-597.
103. J.D. Mott, Z. Werb. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16 (2004), pp. 558-564.
104. Rodríguez D. Morrison C., Overall C. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jan;1803(1):39-54.
105. S. Löffek, O. Schilling, C-W. Franzke. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal* 2011 38: 191-208.
106. Nagase H, Murphy G. Tailoring TIMPs for selective metalloproteinase inhibition. In: Edwards D, Hoyer-Hansen G, Blasi F, Sloane BF, editors. The Cancer Degradome. *Springer Science*; New York: 2008. pp. 787–810.
107. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1803(1):55-71.

108. Hideaki Nagase, Robert Visse, Gillian Murphy. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, Volume 69, Issue 3, 15 February 2006, Pages 562–573.
109. Churg, S. Zhou and J.L. Wright. Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J* 2012; 39: 197–209.
110. Janoff A. Proteases and lung injury. A state-of-the-art mini review. *Chest* 1983; **83**: 54S–58S.
111. Hubbard RC, Fells G, Gadek J, Pacholok S, Humes J, Crystal RG. Neutrophil accumulation in the lung in alpha 1-antitrypsin deficiency. Spontaneous release of leukotriene B4 by alveolar macrophages. *Journal of Clinical Investigation*. 1991;88(3):891-897.
112. Jodie L. Simpson, Vanessa M. McDonald, Katherine J. Baines, et al., “Influence of Age, Past Smoking, and Disease Severity on TLR2, Neutrophilic Inflammation, and MMP-9 Levels in COPD,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, Article ID 462934, p13.
113. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:602–609.
114. Ilumets H, Ryttilä P, Demedts I, et al. Matrix metalloproteinases -8, -9 and -12 in smokers and patients with Stage 0 COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2007;2(3):369-379.

115. Cataldo D, Munaut C, Noel A, *et al.* MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;**123**:259–267.
116. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med* 2003;**97**:634–639.
117. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL, *et al.* Sputum matrix metalloproteinases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med* 2005; **99**: 703–710.
118. Pons AR, Sauleda J, Noguera A, *et al.* Decreased macrophage release of TGF-beta and TIMP 1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; **26**:60-66.
119. Y. Higashimoto, Y. Yamagata, T. Iwata, M. Okada, T. Ishiguchi, H. Sato, M. Masuda, H. Itoh. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *European Respiratory Journal* 2005 **25**: 885-890.
120. PF Mercer, JK Shute, A Bhowmik, GC Donaldson, JA Wedzicha, JA Warner. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respiratory Research*, 2005, Volume 6, Number 1, Page 1.
121. Stanojkovic I, Kotur-Stevuljevic J, Milenkovic B, Spasic S, Vujic T, Stefanovic A, Ilic A, Ivanisevic J. Pulmonary function, oxidative stress and



- inflammatory markers in severe COPD exacerbation. *Respir Med* 2011;105(Suppl 1):S31-7.
122. Zhou M ,Huang SG ,Wan HY ,Li B ,Deng WW ,Li M . Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and the susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in Han population of south China. *Chinese Medical Journal* 2004, 117(10):1481-1484.
123. Stankovic M, Kojic S, Djordjevic V, Tomovic A, Nagorni-Obradovic Lj, Petrovic-Stanojevic N, Mitic-Milikic M, Radojkovic D. Gene-environment interaction between the MMP9 C-1562T promoter variant and cigarette smoke in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Mol Mutagen.* 2016 Jul;57(6):447-454.
124. Segura-Valdez, Lourdes et al. Upregulation of Gelatinases A and B, Collagenases 1 and 2, and Increased Parenchymal Cell Death in COPD. *CHEST*, Volume 117 , Issue 3 , 684 – 694.
125. Jeffrey J. Atkinson, Barbara A. Lutey, Yoko Suzuki, Holly M. Toennies, Diane G. Kelley, Dale K. Kobayashi, Whitney G. Ijem, Gaetan Deslee, Carla H. Moore, M. Eileen Jacobs, Susan H. Conradi, David S. Gierada, Richard A. Pierce, Tomoko Betsuyaku, Robert M. Senior. The Role of Matrix Metalloproteinase-9 in Cigarette Smoke–induced Emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010.
126. Milenković B, Dimić Janjić S, Kotur-Stevuljević J, Kopitović I, Janković J, Stjepanović M, Vukoja M, Ristić S, Davičević-Elez Ž. Validation of Serbian version of Chronic obstructive pulmonary disease assessment test. *Vojnosanitetski pregled* (2018);DOI:<https://doi.org/10.2298/VSP180220094M>

127. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, Crapo R, Enright P, van der Grinten CP, Gustafsson P, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Navajas D, Pedersen OF, Pellegrino R, Viegi G, Wanger J: ATS/ERS Task Force: Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005, 26:319-338.
128. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CPM, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J: Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005, 26:948-968.
129. MacIntyre N, Crapo R, Viegi G, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720–735.
130. American Thoracic Society. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). Recommendations for a standard technique: 1995 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2185–2198.
131. BrianL. Graham, Vito Brusasco, Felip Burgos, BrendanG. Cooper, Robert Jensen, Adrian Kendrick, Neil R. MacIntyre, Bruce R. Thompson, Jack Wanger .Executive Summary: 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *European Respiratory Journal* 2017, 49 (1) 16E0016.
132. Vestbo J, Anderson W, Coxson HO, Crim C, Dawber F, Edwards L, Hagan G, Knobil K, Lomas DA, MacNee W, et al. the ECLIPSE Investigators. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008;31:869–873.

133. Agustí A, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, *et al.*; Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) investigators. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 2010;11:122.
134. Fletcher C, Peto R: The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977, 1:1645–1648.
135. Zbozinkova Z, Barczyk A, Tkacova R, *et al.* POPE study: rationale and methodology of a study to phenotype patients with COPD in Central and Eastern Europe. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2016;11:611-622.
136. Koblizek V, Milenkovic B, Barczyk A, *et al.* Phenotypes of COPD patients with a smoking history in Central and Eastern Europe: the POPE Study. *The European Respiratory Journal*. 2017;49(5):1601446.
137. Li Y, Lu Y, Zhao Z, *et al.* Relationships of MMP-9 and TIMP-1 proteins with chronic obstructive pulmonary disease risk: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2016;21:12.
138. Linder R, Rönmark E, Pourazar J, Behndig A, Blomberg A, Lindberg A. Serum metalloproteinase-9 is related to COPD severity and symptoms - cross-sectional data from a population based cohort-study. *Respiratory Research*. 2015;16(1):28.
139. Brajer B, Batura-Gabryel H, Nowicka A, Kuznar-Kaminska B, Szczepanik A. Concentration of matrix metalloproteinase-9 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and a degree of airway obstruction and disease progression. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59:145–52.

140. Piesiak P, Brzecka A, Kosacka M, Passowicz-Muszynska E, Dyla T, Jankowska R. Concentrations of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pol Merkur Lekarski*. 2011;31:270–3.
141. Ilumets H, Mazur W, Toljamo T, Louhelainen N, Nieminen P, Kobayashi H, et al. Ageing and smoking contribute to plasma surfactant proteins and protease imbalance with correlations to airway obstruction. *BMC Pulm Med*. 2011;11:19.
142. Bolton CE, Stone MD, Edwards PH, Duckers JM, Evans WD, Shale DJ. Circulating matrix metalloproteinase-9 and osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*. 2009;6:81–7.
143. Mercer P, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA, Warner JA. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respir Res* 2005;6:151.
144. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'accardi P, Bousquet J, Bonsignore G. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1945–1950.
145. Vernooij JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EFM. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest* 2004;126:1802–1810.
146. Shuan-Shuan Xie, Feng Hu, Min Tan , Yu-Xiang Duan , Xiao-Lian Song and Chang-Hui Wang. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 and adenylyl cyclase-associated protein 1 in chronic

obstructive pulmonary disease. *Journal of International Medical Research* 2014, Vol. 42(6) 1272–1284.

147. Rohil, et al. MMP1 correlation with COPD and smoking in North India. *Asian Journal of Medical Sciences* 2017, Vol. 8, Issue 1.
148. Montaña M, Sansores RH, Becerril C, Cisneros J, González-Avila G, Sommer B, et al. FEV1 inversely correlates with metalloproteinases 1, 7, 9 and CRP in COPD by biomass smoke exposure. *Respir Res.* 2014;15:74.
149. Omachi TA, Eisner MD, Rames A, et al. Matrix metalloproteinase-9 predicts pulmonary status declines in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Respir Res.* 2010;12:35–5. doi: 10.1186/1465-9921-12-35.
150. Kanner RE, Anthonisen NR, Connett JE. Lower respiratory illnesses promote FEV1 decline in current smokers but Not Ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:358–64.
151. Inga S. Ólafsdóttir, Christer Janson, Lars Lind, Johannes Hulthe, Maria Gunnbjörnsdóttir, Johan Sundstorm. Serum levels of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and their ratio are associated with impaired lung function in the elderly: A population-based study. *Respirology* (2010) 15, 530–535.
152. Oblak I, Anderluh F, Velenik V, Mozina B, Ocvirk J, Ciric E, et al. Differences in plasma TIMP-1 levels between healthy people and patients with rectal cancer stage II or III. *Radiol Oncol.* 2011;45:209–12.

153. Holten-Andersen MN, Murphy G, Nielsen HJ, Pedersen AN, Christensen IJ, Høyer-Hansen G, et al. Quantitation of TIMP-1 in plasma of healthy blood donors and patients with advanced cancer. *Br J Cancer*. 1999;80:495–498.
154. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med*. 2003;97:634–639.
155. Culpitt SV, Rogers DF, Travers SL, Barnes PJ, Donnelly LE. Sputum matrix metalloproteinases: comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respir Med* 2005; 99: 703-710.
156. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1985–1991.
157. Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax*
158. Vlahos R, Wark PAB, Anderson GP, Bozinovski S. Glucocorticosteroids differentially regulate MMP-9 and neutrophil elastase in COPD. *PLoS ONE* 2012;7:e33277.
159. Kang MJ, Oh JM, Lee JCh et al. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstruction of airflow. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 821-827.
160. Seruga-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M et al. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchyma cell health in COPD. *Chest* 2000; 117: 684-694.

161. Gevenois PA , de Maertelaer V , De Vuyst P , Zanen J , Yernault JC . Comparison of computed density and macroscopic morphometry in pulmonary emphysema . *Am J Respir Crit Care Med* . 1995 ; 152 ( 2 ): 653 – 657.
162. D’Armiento JM, Goldklang MP, Hardigan AA, et al. Increased matrix metalloproteinase (MMPs) levels do not predict disease severity or progression in emphysema. *PLoS One*. 2013;8(2):e56352.
163. Koo H-K, Hong Y, Lim MN, Yim J-J, Kim WJ. Relationship between plasma matrix metalloproteinase levels, pulmonary function, bronchodilator response, and emphysema severity. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2016;11:1129-1137.
164. Barjaktarevic, I. et al. Diffusing capacity for carbon monoxide correlates best with tissue volume from quantitative CT scanning analysis. *Chest* 147, 1485–1493.
165. Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Batzios S, et al. Acute exacerbations of COPD are associated with significant activation of matrix metalloproteinase 9 irrespectively of airway obstruction, emphysema and infection. *Respiratory Research*. 2015;16(1):78.
166. Pride NB. Ageing and changes in lung mechanics. *Eur Respir J*. 2005;26(4):563–565.
167. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(3):250–255.

168. Walter RE, Wilk JB, Larson MG, et al. Systemic inflammation and COPD: the Framingham Heart Study. *Chest*. 2008;133(1):19–25.
169. Sin, DD and Man, SF. Why are patients with chronic obstructive pulmonary disease at increased risk of cardiovascular diseases? The potential role of systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation*. 2003; 107: 1514–1519.
170. Sin, DD, Lacy, P, York, E et al. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170: 760–765.
171. Aronson, D, Roterman, I, Yigla, M et al. Inverse association between pulmonary function and C-reactive protein in apparently healthy subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174: 626–632;
172. Gan, WQ, Man, SF, and Sin, DD. The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation. *Chest*. 2005; 127: 558–564;
173. Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarello CM, Ceci F, Di Franco M, Bertazzoni G, Gazzaniga PP, Alessandri C. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Investig Med*. 2003;51:295–300.
174. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Mackenzie IS, Cockcroft JR, Wilkinson IB. C-reactive protein is associated with arterial stiffness in apparently healthy individuals. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol*. 2004; 24:969 –974.
175. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dhakam Z, Pusalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinases-9 and 2, and



serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb and Vasc Biol.* 2005; 25:372–378.

176. Snitker S, Xie K, Ryan KA, et al. Correlation of Circulating MMP-9 with White Blood Cell Count in Humans: Effect of Smoking. Biondi-Zoccai G, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e66277.
177. Torres-Ramos YD, García-Guillen ML, Olivares-Corichi IM, Hicks JJ. Correlation of Plasma Protein Carbonyls and C-Reactive Protein with GOLD Stage Progression in COPD Patients. *The Open Respiratory Medicine Journal*. 2009;3:61-66.
178. Navratilova Z, Zatloukal J, Kriegova E, Kolek V, Petrek M. Simultaneous up-regulation of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8, 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 4 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2012 Aug;17(6):1006-12.
179. Linnea Jarenbäck, Jaro Ankerst, Leif Bjermer, and Ellen Tufvesson, “Flow-Volume Parameters in COPD Related to Extended Measurements of Lung Volume, Diffusion, and Resistance,” *Pulmonary Medicine*, vol. 2013, Article ID 782052, 10 pages, 2013.
180. Jones PW, Brusselle G, Dal Negro PW, Ferrer M, Kardos P, Levy ML, Perez T, Cataluna JJS, van der Molen T, Adamen L, Banin N. Properties of the COPD assessment test in a cross-sectional European study. *Eur Respir Journal* 2011; 38: 29-35

## LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

Ag - antigen

At - antitelo

BAL – bronho-alveolarna lavaža

BEC- Bronhijalne epitelne ćelije

BMI – *engl.* Body Mass Index (Indeks Telesne Mase)

CAT- COPD Assessment Test, Upitnik za procenu HOBP

CEE- Central and Eastern Europe

COPD- *engl.* Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CRP – C reaktivni protein

DC – dendritične ćelije

DLCO - difuzijski kapacitet za ugljenmonoksid

DM – Diabetes Mellitus

ECM - ekstracelularni matriks

EDTA - etilendiaminotetrasirćetna kiselina

EELV - end-ekspiratorni plućni volumen

ELISA - enzyme-linked immunosorbent essay

ERV - ekspiratorni rezervni volumen

FEV1- forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi

FVC - forsirani vitalni kapacitet

GERB - gastroezofagelana refluksna bolest

GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Disease

HOBP - Hronična opstruktivna bolest pluća

HTA – arterijska hipertenzija

IC - inspiratorni kapacitet

IL- interleukin

INF  $\gamma$  – interferon gama

ITGV - ukupni intratorakalni gasni volumen

KCO - carbon monoxide transfer coefficient, koeficijent transfera za ugljenmonoksid

MCH- *engl.* Major Histocompatibility Complex

MMRC – Modified Medical Research Council

MPO - Myeloperoksidaza

NE – Neutrofilna elastaza

RAW – otpor u disajnim putevima

RNI- reaktivni azotni intermedij

ROI- reaktivni oksigeni intermedij

RV - rezidualni volumen

SAT - saturacija krvi kiseonikom

TLC - totalni plućni kapacitet

TT - telesna težina

TV - telesna visina

VC - vitalni kapacitet

## BIOGRAFIJA

Sanja Dimić Janjić, je rođena 19.02.1977. godine u Beogradu.

Medicinski fakultet u Beogradu je završila 2003. godine, a magistarsku tezu je odbranila 2006.godine na temu „Assessment of Women’s Health Status in Republic of Serbia“ na Univerzitetu u Beogradu i Univerzitetu “La Sapienza” u Rimu, na engleskom jeziku.

Specijalizaciju iz interne medicine upisala je 2007/08. školske godine, a ispit položila 2013. godine sa odličnim uspehom.

Doktorsku tezu na temu „Povezanost pokazatelja sistemske inflamacije i sistema proteaza/antiproteaza sa funkcionalnim i kliničkim karakteristikama bolesnika sa hroničnom opstruktivnom bolesti pluća“ je prijavila 2015.godine, a užu specijalizaciju iz uže naučne oblasti Pulmologija je upisala 2016.godine.

Zaposlena je u Klinici za pulmologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu od 2006. godine.

Udata, majka jedne kćeri.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Sanja Dimić Janjić

broj upisa \_\_\_\_\_

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

POVEZANOST POKAZATELJA SISTEMSKE INFLAMACIJE I SISTEMA  
PROTEAZA/ANTIPROTEAZA SA FUNKCIONALNIM I KLINIČKIM  
KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA SA HRONIČNOM  
OPSTRUKTIVNOM BOLESTI PLUĆA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 19.07.2018.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sanja Dimić Janjić

Broj upisa

---

Studijski program Doktorska disertacija

Naslov rada : POVEZANOST POKAZATELJA SYSTEMSKE INFLAMACIJE I  
SYSTEMA PROTEAZA/ANTIPROTEAZA SA FUNKCIONALNIM I  
KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA SA HRONIČNOM  
OPSTRUKTIVNOM BOLESTI PLUĆA

Mentor Prof.dr Branislava Milenković

Potpisani Sanja Dimić Janjić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**



U Beogradu, 19.07.2018.

---

### Prilog 3.

#### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: POVEZANOST POKAZATELJA SISTEMSKE INFLAMACIJE I SISTEMA PROTEAZA/ANTIPROTEAZA SA FUNKCIONALNIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA BOLESNIKA SA HRONIČNOM OPSTRUKTIVNOM BOLESTI PLUĆA , koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**



U Beogradu, 19.07.2018.

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.