

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Dejan Marčetić

**ULOGA POLIMORFIZAMA GENA ACE2 U SISTEMSKOM
UPALNOM ODGOVORU U BOLESNIKA S KRONIČNOM
OPSTRUKTIVNOM PLUĆNOM BOLESTI**

Doktorska disertacija

Osijek, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Biologija, Temeljne medicinske znanosti

ULOGA POLIMORFIZAMA GENA *ACE2* U SISTEMSKOM UPALNOM ODGOVORU U BOLESNIKA S KRONIČNOM OPSTRUKTIVNOM PLUĆNOM BOLESTI

Dejan Marčetić

Disertacija je izrađena u: Klinici za plućne bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Jordanovac 104 i u Laboratoriju za naprednu genomiku, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, Bijenička cesta 54.

Mentori: mentorica 1 naslovna doc. dr. sc. Jelena Knežević, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i docentica Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i mentorica 2 doc. dr. sc. Andrea Vukić Dugac, dr. med., specijalist interne medicine, subspecijalist pulmolog Klinike za plućne bolesti Jordanovac, KBC Zagreb i docentica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Kratki sažetak doktorske disertacije: Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je progresivna upalna bolest dišnog sustava čiji razvoj uključuje međudjelovanje okolišnih i genetskih čimbenika. Gen *ACE2*, koji kodira enzim uključen u proturegulacijsku osovinu RAAS sustava, ima važnu ulogu u modulaciji upalnog odgovora a genetske varijacije unutar ovog gena mogle bi doprinijeti razvoju i težini bolesti. Ova studija istražuje povezanost jednonukleotidnih polimorfizama (SNP) rs2285666 i rs879922 u genu *ACE2* sa sistemskim upalnim odgovorom kod bolesnika koji boluju od KOPB-a. U istraživanje je bilo uključeno 313 bolesnika s KOPB-om i 263 zdrava ispitanika. Genotipizacija je provedena PCR metodom a aktivnost upale određivanjem koncentracije upalnih biomarkera (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , neutrofila, CRP-a i fibrinogena) ELISA testom i standardnim hematološkim analizama. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u distribuciji genotipova između bolesnika i kontrola za oba ispitivana polimorfizma. Uz to, identificirana je povezanost određenih genotipova s povišenim razinama neutrofila, CRP-a i citokina IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α . Nije pronađena značajna povezanost s plućnom funkcijom. Ekspresijska analiza *ACE2* nije bila izvediva zbog niske razine ekspresije u uzorcima. Ovi nalazi ukazuju na mogući utjecaj *ACE2* genetskih varijacija na upalne procese u KOPB-u ali su potrebna daljnja istraživanja kako bi se potvrdila njihova klinička važnost.

Broj stranica: 105

Broj slika: 52

Broj tablica: 18

Broj literaturnih navoda: 210

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: KOPB, *ACE2*, jednonukleotidni polimorfizmi, sistemska upala, genetska predispozicija

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc. dr. sc. Petar Ozretić, viši znanstveni suradnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i docent u naslovnom zvanju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; predsjednik
2. akademik Miroslav Samaržija, specijalist interne medicine, pulmolog i predstojnik Klinike za plućne bolesti Jordanovac KBC Zagreb i profesor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; član
3. izv. prof. dr. sc. Anita Matić, izvanredna profesorica Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; član
4. prof. dr. sc. Nada Oršolić, redovita profesorica u trajnom zvanju Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; zamjena

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary Area of Science
Scientific Fields: Biology and Basic Medical Sciences

THE ROLE OF *ACE2* GENE POLYMORPHISMS IN THE SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Dejan Marčetić

Thesis performed at: Department of Lung Diseases Jordanovac, Zagreb University Hospital Centre, Jordanovac 104, Laboratory for Advanced Genomics, Division of Molecular Medicine, Ruder Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb.

Supervisor/s: mentor 1: Adj. Assist. Prof. Jelena Knežević, PhD, Senior Research Scientist at Ruder Bošković Institute, Zagreb, and Assistant Professor at the Faculty of Dental Medicine and Health, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, and

mentor 2: Assist. Prof. Andrea Vukić Dugac, PhD, MD, Specialist in Internal Medicine, Subspecialist in Pulmonology at the Jordanovac Department of Lung Diseases, Zagreb University Hospital Centre, and Assistant Professor at the School of Medicine, University of Zagreb.

Short abstract: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a progressive inflammatory airflow disease, the development of which involves interaction of genetic and environmental factors. The *ACE2* gene that codes the enzyme included in the counter-regulatory axis of the RAAS system has a major role in the inflammatory response modulation, and genetic variations in this gene may contribute to the development and severity of the disease. This study investigated the association of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs2285666 and rs879922 in the *ACE2* gene with systemic inflammatory response in COPD patients. The study included 313 COPD patients and 263 healthy subjects. Genotyping was performed by the PCR method, whereas concentrations of inflammatory biomarkers (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , neutrophils, CRP, and fibrinogen) were determined by ELISA and standard haematologic analysis. The results showed a statistically significant difference in genotype distribution between COPD patients and control subjects for both study polymorphisms. In addition, study results identified the association of particular genotypes with elevated levels of neutrophils, CRP and the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α . There was no significant association with pulmonary function test results. *ACE2* expression could not be performed due to low expression in the samples. These findings suggest the possible impact of *ACE2* genetic variations on inflammatory processes in COPD, however, additional research is needed to confirm their clinical relevance.

Number of pages: 105

Number of figures: 52

Number of tables: 18

Number of references: 210

Original in: Croatian

Key words: COPD, *ACE2*, single nucleotide polymorphisms, systemic inflammation, genetic predisposition

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. **Assist. Prof. Petar Ozretić, PhD**, Senior Research Scientist at Ruder Bošković Institute, Zagreb, and Assistant Professor with title at Josip Juraj Strossmayer University of Osijek; president
2. **Academician Miroslav Samaržija**, specialist in Internal Medicine, pulmonologist and head of the Jordanovac Department of Lung Diseases, Zagreb University Hospital Centre, and Professor at the Zagreb School of Medicine, University of Zagreb; member
3. **Assoc. Prof. Anita Matić, PhD**, Associate Professor at the Faculty of Dental Medicine and Health, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek; member
4. **Professor Nada Oršolić, PhD**, Tenured Professor at the Faculty of Science, University of Zagreb; substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentoricama doc.dr.sc. Jeleni Knežević i doc.dr.sc. Andrei Vukić Dugac na nesebičnoj pomoći u svako doba dana, na korisnim savjetima i podršci ulijevajući mi svakodnevnu nadu da ćemo uspjeti.

Zahvaljujem svima koji su pomogli tijekom prikupljanja ispitanika, obrade podataka i provođenja eksperimentalnog dijela disertacije na Institutu Ruđer Bošković;

Svim vrijednim rukama koje su na bilo koji način doprinijele izradi ovoga rada;

Obitelji koja mi je bila podrška i putokaz u svim otežavajućim situacijama.

POPIS KRATICA

ACEi, inhibitor angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors*)

ACE, angiotenzin konvertirajući enzim (engl. *Angioenzin-Converting Enzyme*)

ACE2, angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. *Angioenzin-Converting Enzyme 2*)

ADAM17, petidaza ADAM17, (engl. *A Disinterin And Metalloproteinase 17*)

ANG I, angiotenzin I

ANG II, angiotenzin II

ANG 1-7, angiotenzin 1-7

ARBs, antagonisti angiotenzinskih II receptora, (engl. *Angiotensin II Receptor blockers*)

ATS, Američko torakalno društvo, (engl. *American Thoracic Society*)

AT1R, angiotenzin II tip 1 receptor

AT2R, angiotenzin II tip 2 receptor

CAT, test za procjenu KOPB-a (engl. *COPD Assessment Test*)

cDNA, komplementarna DNA (engl. *complementary DNA*)

CHRNA3/5 gen, gen za podjedinicu nikotinskog acetilkolinskog receptora (engl. *Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 3/5*)

Ct, broj ciklusa (engl. *Cycle treshold*)

DPI, inhaler koji isporučuje lijek u obliku praha, (engl. *Dry Powder Inhaler*)

DNA, (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

DNK, deoksiribonukleinska kiselina

EDTA, etilendiamintetraocetna kiselina, (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

ELISA (engl. *enzyme -linked immunosorbent assay*)

ERS, Europsko respiratorno društvo, (engl. *European Respiratory Society*)

FEV₁, forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi (engl. *Forced Expiratory Volume in first second*)

FVC, forsirani vitalni kapacitet (engl. *Forced Vital Capacity*)

g (x g), sila ubrzanja gravitacije

GOI, gen od interesa

GOLD, Globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest, (engl. *Global*

Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)

GTS gen, gen za glutation S-transferazu (engl. *Glutathione S-Transferase*)

GWAS, genomska asocijacijska studija (engl. *Genome-Wide Association Study*)

HHIP gen, gen za hedgehog interakcijski protein (engl. *Hedgehog-Interacting Protein*)

ICS, inhalacijski kortikosteroidi (engl. *Inhaled Corticosteroids*)

IgE, imunoglobulin E

IL-4R α , (engl. Interleukin-4 Receptor Alpha)

IL, interleukin (engl. *interleukin*)

IL-1 α , interleukin-1 alfa (engl. *Interleukin-1 alpha*.)

IL-1 β , interleukin-1 beta (engl. *interleukin-1 beta*)

IQR, interkvartilni raspon

kb, kilobaza

KBC, Klinički bolnički centar

KOPB, kronična opstruktivna plućna bolest

LABA, dugodjelujući β 2-agonisti (engl. *Long-Acting Beta Agonist*)

LAMA, dugodjelujući muskarinski antagonisti (engl. *Long-Acting Muscarinic Antagonist*)

LDCT, niskodozna kompjuterizirana tomografija (engl. *Low-Dose Computed Tomography*)

M, molarna koncentracija (molaritet)

MAF, učestalost manje zastupljenog alela (engl. *Minor Allele Frequency*)

MAPK, signalni put (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MasR, receptor Mas

MCP-1, citokin monocitni kemotaktični protein-1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

MDI, inhaler koji isporučuje lijek u obliku aerosola (engl. *Metered Dose Inhaler*)

mg, miligram, jedinica za masu

MgCl₂, magnezijev klorid

mL, mililitar

mM, milimol

MMP-12 gen, gen za matriksnu metaloproteinazu 12 (engl. *Matrix Metalloproteinase-12*)

mMRC skala, modificirana skala zaduhe (engl. *Modified Medical Research Council Dyspnoea*)

scale)

mRNA, glasnička RNA (engl. *messenger Ribonucleic Acid*)

MSCT, multislojna kompjutorizirana tomografija (engl. *Multislice Computed Tomography*)

μL, mikrolitar

n, veličina uzorka

NaCl, natrijev klorid

NCBI, znanstvena baza podataka Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl.

National Center for Biotechnology Information)

NF-κB, signalni put nuklearni faktor kappa B, (engl. *Nuclear Factor Kappa B*)

NIV, neinvazivna mehanička ventilacija

NK stanice, prirodne stanice ubojice (engl. *Natural Killer Cells*)

NT-proBNP, marker srčane insuficijencije (engl. *N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide*)

OR, omjer izgleda, (engl. *Odds Ratio*)

PCR, lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

PD, peptidazna domena

PEF, vršni ekspiracijski protok (engl., *Peak Expiratory Flow*)

pH, logaritamska mjera koncentracije vodikovih iona, (engl. *potential of hydrogen*)

PubMed, znanstvena baza podataka

RAAS, renin angiotenzin aldosteronski sustav

RBD, domena vezanja receptora (engl. *Receptor-Binding Domain*)

RCLB, (engl. *Red Cell Lysis Buffer*)

RNK, ribonukleinska kiselina

ROS, reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*)

rs879922, jednonukleotidni polimorfizam u genu *ACE2*

rs2285666, jednonukleotifni polimorfizam u genu *ACE2*

RT-PCR, lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time*)

RT-qPCR, metoda kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Quantitative PCR*)

SABA, kratkodjelujući β2-agonisti (engl. *Short-Acting Beta Agonist*)

sACE2, solubilni/topljivi ACE2

SAMA, kratkodjelujući muskarinski antagonisti (engl. *Short-Acting Muscarinic Antagonist*)

SARS-CoV, virus SARS-CoV (engl. *Severe Acute Respiratory Coronavirus*)

SARS-CoV-2, virus SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Coronavirus 2*)

SDS, pufer za lizu proteina (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SERPINA 1, gen koji kodira alfa-1-antitripsin (engl. *Serpin Family A Member 1*)

SNP, jednonukleoidni polimorfizam (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)

SP, signalni peptid

STATs, signalni put (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*,)

TaqMan probe, specifična oligonukleotidan sonda, izvedeno od enzima Taq polimeraze

TE pufer, pufer koji sadrži Tris + EDTA

Th2 upala, upala posredovana T-pomoćničkim limfocitima tipa 2 (engl. *T-helper 2*)

TNF- α , faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor-alpha*)

Tris-HCl, puferka otopina tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorid

TSLP, citokin timusni stromalni limfopoetin (engl. *Thymic Stromal Lymphopoietin*)

UV/VIS spektrofotometar, (engl. *Ultraviolet-visible spectroscopy*), ultraljubičasto vidljiva spektrofotometrija omogućuje kvantifikaciju nukleinskih kiselina temeljem njihove apsorpcije svjetlosti pri specifičnim valnim duljinama

Zn²⁺, ion cinka

qPCR, reakcija lančanog umnožavanja u stvarnom vremenu (engl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

χ^2 test, Hi-kvadrat test, statistička metoda za ispitivanje odnosa između dviju varijabli

°C, stupanj Celzijus, standardna jedinica za temperaturu

Sadržaj

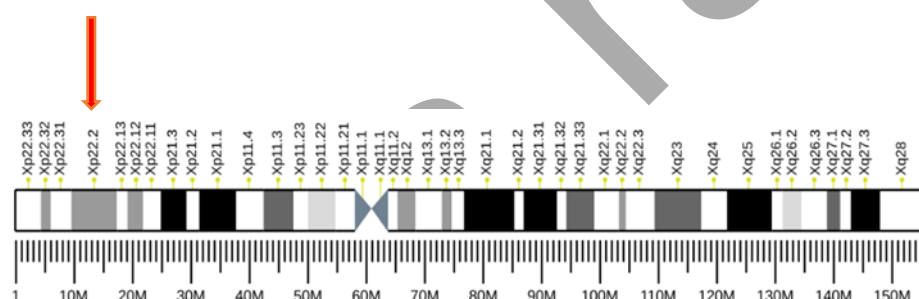
1	UVOD	1
1.1	Angiotenzin-konvertirajući enzim 2	1
1.2	Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB)	6
1.3	Upala u patogenezi KOPB-a	11
1.4	ACE2 i KOPB	14
1.5	Polimorfizmi u genima za ACE2	16
1.6	Svrha rada	20
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	22
2.1	Ciljevi istraživanja	22
2.1.1	OPĆI CILJ	22
2.1.2	SPECIFIČNI CILJEVI	22
2.2	Hipoteza	23
3	MATERIJALI I METODE	24
3.1	Ispitanici	24
3.2	Metode	24
3.2.1	Spirometrija	24
3.2.2	Uzorci periferne krvi	25
3.2.3	Izolacija genomske DNA metodom isoljavanja	26
3.2.4	Reakcija lančanog umnožavanja genomske DNA (engl. polymerase chain reaction - PCR) primjenom specifičnih proba (TaqMan, Applied Biosystems)	26
3.2.5	Izolacija RNA iz stanica periferne krvi i RT-PCR	27
3.2.6	Odabir polimorfnih biljega iz baza podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for Biotechnology Information, NCBI</i>)	28
3.2.7	ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)	29
3.2.8	Statistička obrada podataka	29
4	REZULTATI	31
4.1	Rezultati analize općih karakteristika ispitanika	31
4.2	Rezultati analize odabira polimorfnih biljega	34
4.3	Rezultati analize povezanosti odabranih polimorfnih biljega gena ACE2 u skupini ispitanika s KOPB-om i zdravih ispitanika	35
4.4	Rezultati analize relativne ekspresije gena ACE2 poznatim genotipom	37
4.5	Rezultati funkcionalne analize testiranih SNP-ova	41

4.5.1	Rezultati analize povezanosti serumske koncentracije proupalnih citokina IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) s polimorfizmima rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 u bolesnika s KOPB-om	41
4.5.1.1	Rezultati analize povezanosti serumske koncentracije proupalnih citokina IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) s polimorfizmom rs2285666 unutar gena ACE2 u bolesnika s KOPB-om	41
4.5.1.2	SNP rs2285666 u dominantnom genetičkom modelu gena ACE2 i koncentracija IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu.....	45
4.5.1.3	SNP rs879922 gena ACE2 i koncentracija IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu	48
4.5.1.4	SNP rs879922 u dominantnom genetičkom modelu gena ACE2 i koncentracija IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu.....	52
4.5.2	Rezultati analize povezanosti općih upalnih biljega -neutrofila, CRP-a i fibrinogena s polimorfizmima rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 u bolesnika s KOPB-om	56
4.5.2.1	SNP rs2285666 gena ACE2 i koncentracija neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu.....	56
4.5.2.2	SNP rs2285666 u dominantnom genetičkom modelu gena ACE2 i vrijednosti općih upalnih biljega – neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu	59
4.5.2.3	SNP rs879922 gena ACE2 i koncentracija neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu	62
4.5.2.4	SNP rs879922 u dominantnom genetičkom modelu gena ACE2 i vrijednosti općih upalnih biljega – neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu	65
4.5.3	Rezultati analize povezanosti testiranih polimorfizama rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 sa fenotipskim obilježjima KOPB-a (plućna funkcija)	68
4.5.3.1	Rezultati analize povezanosti parametara plućne funkcije (FEV1 i FVC) s polimorfizmima rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 u bolesnika s KOPB-om	68
4.5.3.2	Rezultati analize povezanosti težine bolesti prema GOLD klasifikaciji s polimorfizama rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 u bolesnika s KOPB-om	69
4.6	Preživljenje bolesnika s KOPB-om u odnosu na varijante gena ACE2	70
5.	RASPRAVA.....	74
6.	ZAKLJUČCI	81
7.	LITERATURA	82
8.	SAŽETAK	97
9.	SUMMARY	99
10.	PRILOZI.....	101
11.	ŽIVOTOPIS	103

1 UVOD

1.1 Angiotenzin-konvertirajući enzim 2

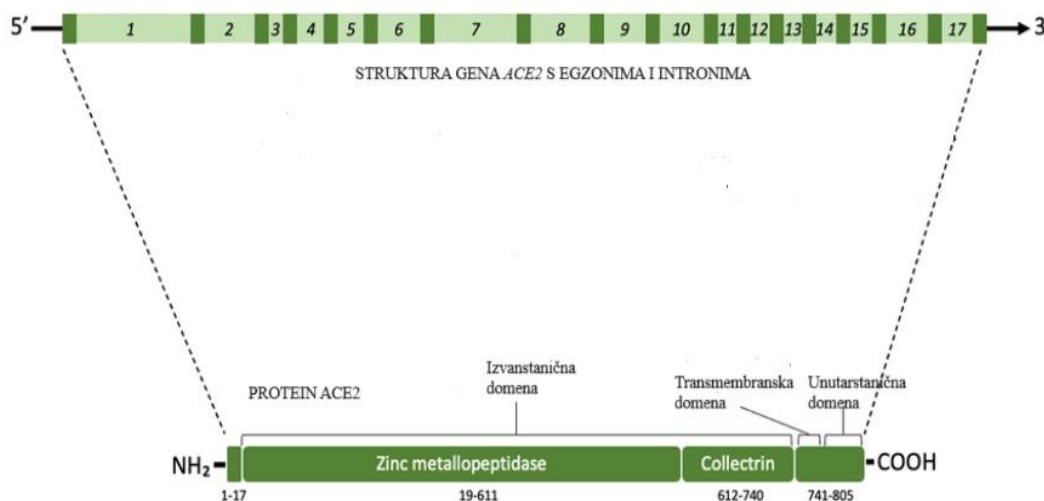
Angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme 2*, ACE2) je protein kodiran genom *ACE2*, smještenim na kromosomu X (citogenetička lokacija Xp22.2), koji obuhvaća 39,98 kilobaza (kb) genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNK) (1). Gen kodira protein od 805 aminokiselina, sastoji se od 18 kodirajućih regija tzv. egzona i 17 nekodirajućih regija tzv. introna (2–4). Shematski prikaz citogenetičke lokacije gena *ACE2* prikazan je na Slici 1a.



Slika 1a. Citogenetička lokacija gena *ACE2*. Preuzeto i prilagođeno ljubaznošću (5).

Gen *ACE2* sastoji se funkcionalno od četiri regije. Regija 5' UTR predstavlja strukturalno početni dio gena. Smještena je prije prvog egzona, izravno ne sudjeluje u transkripciji. Sadrži vezna mjesta za transkripcijske faktore za aktivaciju ili inhibiciju ekspresije gena te na ovaj način mehanizmom funkcionalne regulacije sudjeluje u proizvodnji budućeg proteina ACE2. Slijedi kodirajuća regija, egzoni 1-18, koja sudjeluje u transkripciji odnosno sadrži upute za sintezu proteina ACE2. Egzoni 1-3 sudjeluju u nastanku buduće signalne sekvence koja čini dio proteina koji omogućava njegov pravilan transport unutar stanice prije no što postane funkcionalan. Egzoni 4-10 sudjeluju u nastanku buduće izvanstanične katalitičke domene, egzoni 11-16 transmembranske, a 17-18 unutarstanične domene. Regija 3' UTR koja ne sudjeluje izravno u transkripciji, smještena je nakon posljednjeg egzona 18, sadrži upute za stabilnost mRNA (engl. *messenger Ribonucleic Acid*). Ostatak gena čine introni, nekodirajuće regije između egzona. Introni sadrže informacije kojima reguliraju ekspresiju gena (mogu

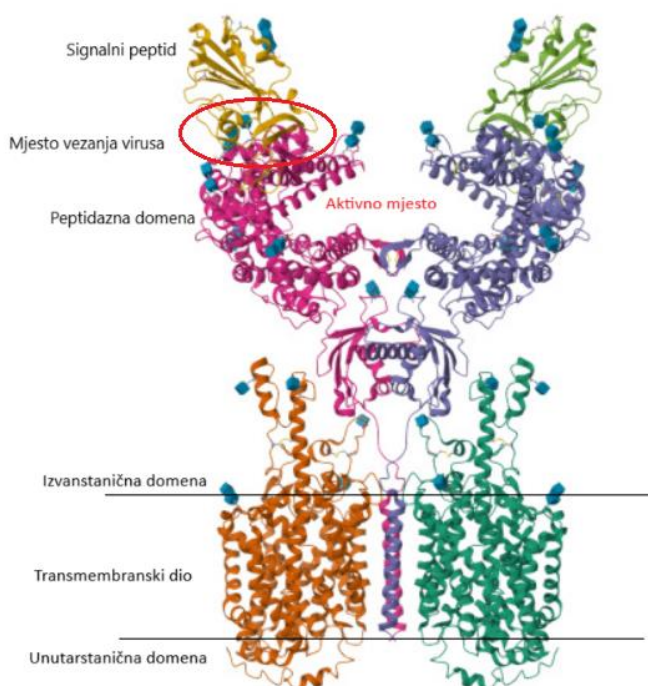
kontrolirati kada i gdje će se stvarati ACE2), alternativno spajanje (engl. *splicing*) što omogućuje varijacije proteina ACE2 čime mogu utjecati na njihovu funkciju te sudjeluju u održavanju genetske stabilnosti (mogu smanjiti rizik od mutacija u funkcionalnim dijelovima gena) (2). Shematski prikaz smještaja i strukture gena *ACE2* prikazan je na Slikama 1b, 1c.



Slika 1b. Shematski prikaz strukture gena i proteina ACE2. Gen se sastoji od 18 egzona (tamnozeleni) i 17 introna (svijetlozeleni). ACE2 protein uključuje 805 aminokiselina sa različitim regijama i domenama. Preuzeto i prilagođeno ljubaznošću (6).

Strukturu ACE2 proteina čini nekoliko važnih domena; izvanstanična, transmembranska i unutarstanična domena. Izvanstanična domena na samome početku sadrži dio koji se zove signalni peptid (SP) koji usmjerava novonastali protein prema endoplazmatskom retikulumu tijekom sinteze, te omogućuje pravilnu obradu i transport proteina unutar stanice. Drugi dio čini peptidazna domena (PD) koja sadrži dio sa cinkovim ionom (Zn^{2+}) te predstavlja dio proteina koji je odgovoran za enzimsku aktivnost ACE2. Ovdje se odvija katalitička aktivnost kao dio renin angiotenzin aldosteronske kaskade (engl. *Renin Angiotensin Aldosterone System*, RAAS) sa pretvaranjem angiotenzina II (Ang II) u angiotenzin 1-7 (Ang 1-7) koji ima vazodilatatorno i protuupalno djelovanje (2) (7). Domena vezanja receptora (engl. *Receptor-Binding Domain*, RDB) virusa SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute*

Respiratory Coronavirus 2) drugi je važan dio PD domene te omogućuje vezanje sa SARS-CoV i SARS-CoV-2 virusom dopuštajući mu da uđe u stanicu domaćina mehanizmom endocitoze kompleksa ACE2-virus (8) (9). Obzirom da je ACE2 tip I membranski protein, jedan transmembranski α -heliks prolazi kroz membranu stanice, čini transmembransku domenu te osigurava funkciju ACE2 kao receptora. Citoplazmatska domena mala je citosolna regija koja nije katalitički aktivna, smještena je u unutarstaničnom dijelu proteina te sudjeluje u signalizaciji i interakciji s drugim proteinima (2). Shematski prikaz strukture proteina ACE2 sa funkcionalnim domenama prikazan je na Slici 1c.



Slika 1c. 3D struktura ACE2 proteina sa funkcionalnim domenama. Preuzeto i prilagođeno prema (10)

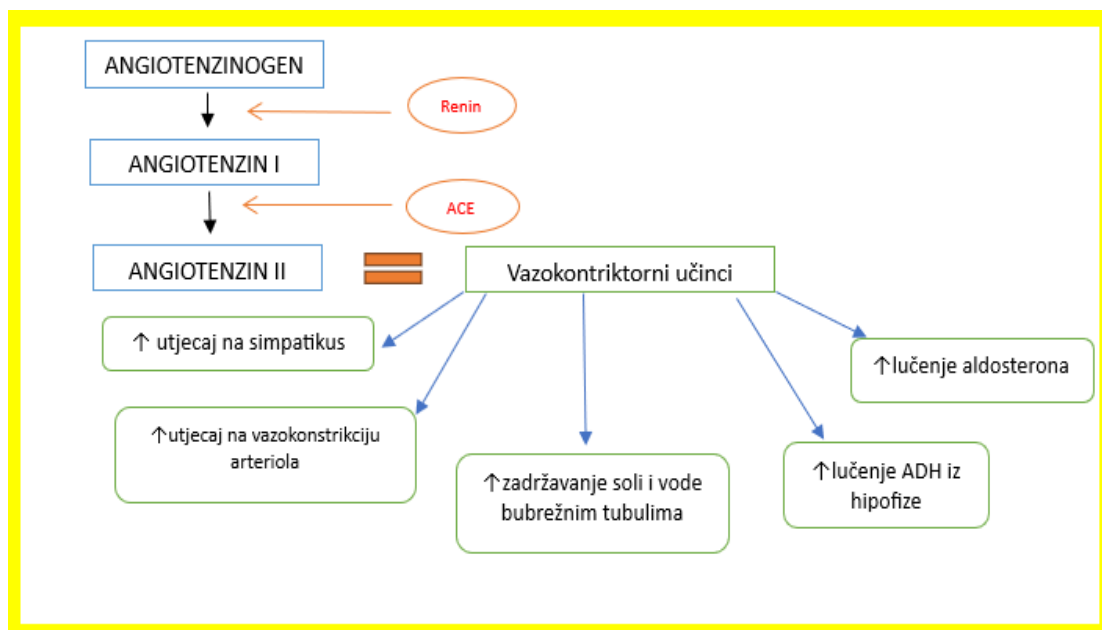
Funkcionalno protein ACE2 ima višestruku ulogu. Osim što je receptor za ulazak SARS-CoV (engl. *Severe Acute Respiratory Coronavirus*) i SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Coronavirus*) virusa u stanicu, transporter aminokiselina u tankom crijevu čime pomaže u apsorpciji aminokiselina, najbolje proučenu funkciju predstavlja enzimska uloga kao dio kaskade renin angiotenzin aldosteronskog sustava (RAAS) (11). Smještajem vezan za

membranu stanice, poznat je i cirkulirajući ACE2 tzv. solubilni ACE2 (sACE2) (12). Solubilni ACE2 protein nastaje pod utjecajem proteaze ADAM17 (engl. *A Disintegrin And Metalloproteinase 17*) prekidanjem ekstracelularnog dijela ACE2 proteina sa membrane koji se onda istisne u izvanstanični prostor (13). Kao takav može se detektirati u krvotoku i tjelesnim tekućinama. Transmembranski ACE2 izražen je na različitim epitelnim stanicama. Nalazimo ga i u plućima gdje je smješten na površini alveolarnih stanica tip I i II, te endotelnim stanicama plućnih krvnih žila (14). Osim u plućima ima ga na epitelnim i endotelnim stanicama srca, bubrega, jetre, crijeva, središnjeg živčanog sustava. Sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, ravnoteže tekućine i elektrolita te regulaciji sistemske cirkulacije (15) (11). Aktivira se kao kompenzacijski mehanizam u stanjima smanjenog cirkulirajućeg volumena s ciljem zadržavanja tekućine i elektrolita u sistemske cirkulaciji.

Sustav RAAS kaskade aktivira se kao odgovor bubrega na smanjeni protok krvi tj. perfuziju. Renin, proteolitički enzim, izlučuje se iz jukstaglomerularnih stanica bubrega koje se nalaze u stijenci aferentne arteriole. Jukstaglomerularni aparat koji predstavlja funkcionalno važnu, morfološki mikroskopsku strukturu u bubrezima koja regulira funkciju nefrona kao osnovne jedinice bubrega, sastoji se od jukstaglomerularnih stanica, macule dense i ekstraglomerularnih mezangijskih stanica. Macula densa je nakupina gusto složenih stanica u stijenci distalnog tubula koje detektiraju promjene u koncentraciji natrijevog klorida i potiču izlučivanje renina iz jukstaglomerularnih stanica. Ekstraglomerularne mezangijske stanice nalaze se između aferentne i eferentne arteriole, imaju kontraktilna svojstva koja pomažu u komunikaciji između macule dense i jukstaglomerularnih stanica tj. u regulaciji protoka krvi kroz glomerul (16).

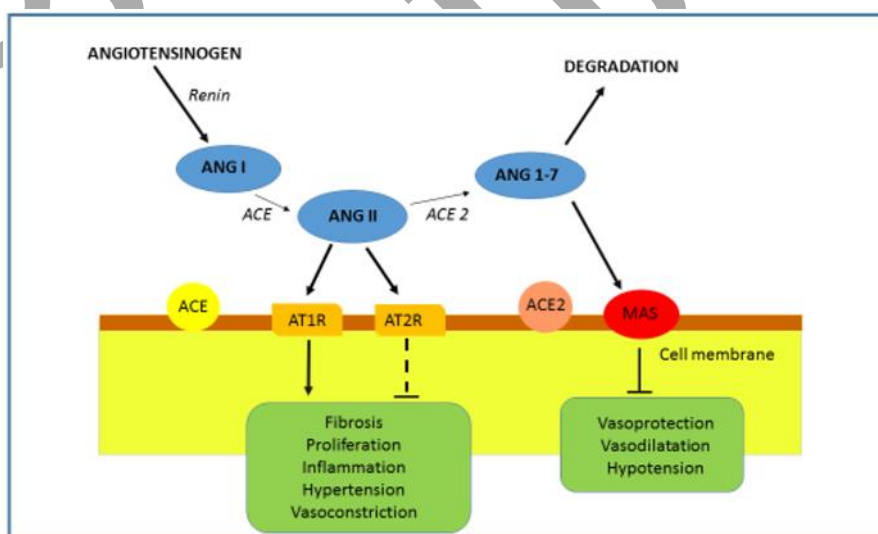
Uloga renina je da iz jetrenog angiotenzinogena stvori angiotenzin I (Ang I). Ang I ima slab biološki učinak, no dok se putem plućnog ACE pretvori u angiotenzin II (Ang II) počinje njihova vazokonstriktorna kaskada. U daljnjoj kaskadi Ang II svoj vazokonstriktorni učinak postiže djelovanjem na autonomni živčani sustav, bubrežne i sistemske krvne žile, bubrežne tubule, nadbubrežne žlijezde i stražnji režanj hipofize (Slika 2). Glavni vazoaktivni peptid u kaskadi je Ang II koji nastaje posredovanjem plućnog enzima angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE), iz Ang I. Ang II svoje djelovanje postiže putem receptora angiotenzin II tip 1 (AT1R) i angiotenzin II tip 2 (AT2R) receptora.

Pretpostavlja se da ACE2 u sustavu kaskade RAAS ima važnu regulatornu ulogu tako što djeluje kao oponent angiotenzinu II za koji je poznato da ima snažno proupalno, vazokonstriktorno i profibrotičko djelovanje (17).



Slika 2. Shematski prikaz djelovanja Ang II. Preuzeto i prilagođeno prema (18)

Funkcionalno, ACE2 je karboksipeptidaza koja održava homeostazu između dobrih i loših učinaka aktivacije RAAS-a, posrednik je u aktiviranju protuupalnih i antifibrotičkih mehanizama. U kaskadi RAAS protein ACE2 pretvara Ang II u angiotenzin 1-7 (Ang 1-7), čija je aktivnost posredovana putem receptora Mas (MasR). Vezanje Ang 1-7 na Mas R rezultira vazodilatacijom te se pospješuju protuupalni, antihipertrofički, antiproliferativni i antifibrotički učinci. Učinak Ang 1-7 putem AT2R i MasR čini ih čini potencijalnim čuvarima pluća (Slika 3) (19).



Slika 3. Shematski prikaz djelovanja ACE2. Preuzeto iz (18)

Slijedom navedenoga, predložen je signalni mehanizam ACE2/Ang1-7/MasR koji štiti pluća od upale i fibroze, nasuprot signalnog puta ACE/AngII/AT1R koji je odgovoran za plućno oštećenje i ima ulogu u patogenezi kroničnih plućnih upalnih i fibrozirajućih bolesti – plućne hipertenzije i plućne fibroze (20). Osim „dobrih“, istraživanja su pokazala i onu „lošu“ stranu aktivacije signalnog puta RAAS, kako sistemskog, tako i tkivnog, u patogenezi hipertenzije, srčanog zatajenja, bubrežnih bolesti, ateroskleroze, srčane hipertrofije, dijabetesa tipa 2, fibroze bubrega i upalnih bolesti pluća (21).

1.2 Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB)

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je prema definiciji Globalne inicijative za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest GOLD (engl. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) heterogena bolest pluća, karakterizirana kroničnim respiratornim simptomima (zaduha, kašalj, iskašljavanje) uslijed promjena u dišnim putovima (bronhitis, bronhiolitis) i/ili alveolama (emfizem) koje uzrokuju perzistentnu, često progresivnu bronhoopstrukciju (22) (23).

Od KOPB-a boluje oko 10% populacije, a godišnje u svijetu umre oko 3,3 milijuna bolesnika (24) (25). Trenutno je treći vodeći uzročnik smrti u svijetu nakon kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti s porastom incidencije i prevalencije, a 90% tih loših ishoda u bolesnika s KOPB-om događa se u zemljama u razvoju (nizak do srednji stupanj dohotka) (26) (27) (28). Predstavlja značajan javnozdravstveni problem zbog stope morbiditeta i mortaliteta, preuranjene smrtnosti, ukupnih troškova liječenja dok su mogućnosti farmakoloških intervencija još uvijek uglavnom simptomatske. Cigaretni dim smatra se značajnim rizičnim čimbenikom za razvoj bolesti ali genetska predispozicija uz utjecaj ostalih okolišnih čimbenika kao što su udisanje toksičnih čestica i plinova, modeliraju patogenezu bolesti (29). Unatoč velikim naporima na globalnoj razini u cilju smanjenja kulture pušenja ipak se nije postigao očekivani napredak u smanjenju incidencije KOPB-a. Znamo da svega 20% pušača oboli od KOPB-a te su novija istraživanja temeljena na traganju za ostalim potencijalno mogućim modulatorima u nastanku bolesti: genetskoj predispoziciji, događajima u prenatalnom razdoblju i djetinjstvu, ponavljajućim respiratornim infekcijama, izloženosti onečišćenju zraka i dimu iz biomase (30) (31) (32). Pacijenti koji nisu pušači a obole od KOPB-a usporedno sa pušačima koji boluju od iste bolesti obično su mlađe životne dobi i imaju bolju funkciju pluća od

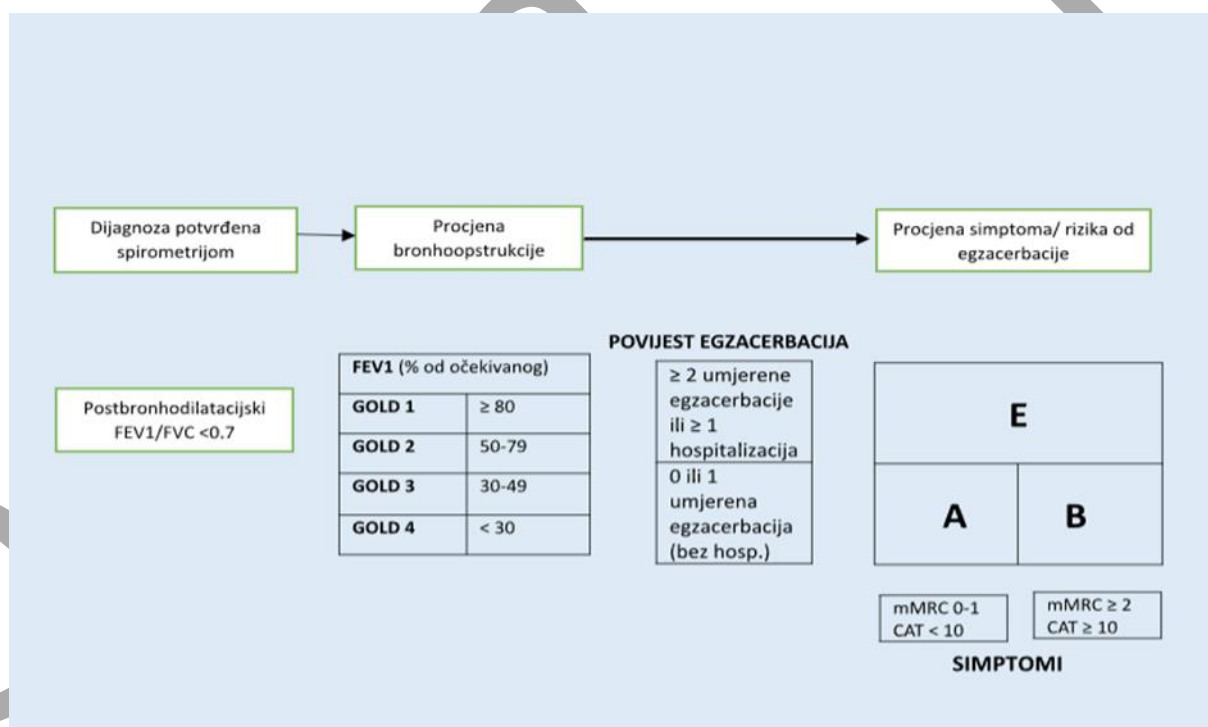
pacijenata koji razviju KOPB kao posljedicu pušenja (33). Učestalost bolesti varira među spolovima, regijama i socio-ekonomskom statusu (34). Nešto je veća prevalencija bolesti u muškaraca što se objašnjava prvenstveno pušačkim stažem i izloženošću štetnim inhalacijskim česticama (30). Ipak, u žena koje obole od KOPB-a, prati se brži tijek bolesti. Postoje geografske razlike prevalencije i incidencije, no još uvijek nedostaju velike studije koje bi mogle komparirati cijeli svijet obzirom da siromašne zemlje Afrike nisu dovoljno istražene (35). Oboljeli od KOPB-a uvelike su razlikuju u kliničkoj prezentaciji bolesti uključujući učestalost pogoršanja, razinu tjelesne izdržljivosti (zaduhe) i razvoj kaheksije.

Ranije shvaćana kao izolirana bolest, za KOPB se danas smatra da je dio multisistemskog procesa koji obilježava upalni odgovor pluća na različite iritanse iz okoline, praćen infiltracijom upalnih stanica; neutrofila, makrofaga i limfocita, uz značajan doprinos izvanplućnih zbivanja koja doprinose težini bolesti (36) (37). Bolest karakterizira pojačana sekrecija sluzi, disfunkcija cilijarnog aparata, ograničenje protoka zraka u izdisaju uz hiperinflaciju i poremećenu izmjenu plinova što se klinički prezentira kroničnim kašljem s iskašljavanjem uz stupnjeviti razvoj zaduhe. Opstrukcija protoka zraka u izdahu najvažniji je patofiziološki poremećaj koji se može objektivizirati.

Dijagnoza KOPB-a često je izazovna. Uz spirometriju kao zlatni standard, jednaku težinu u postavljanju dijagnoze nosi anamneza s naglaskom na radnu izloženost i pušački staž. U potpunom fenotipiziranju bolesti i objektiviziranju komorbiditeta koristimo još biokemijske parametre iz periferne krvi i status respiratornih plinova, uvid u intratorakalni status sumacijskom snimkom torakalnih organa ili MSCT-om toraksa, elektrokardiogram te ehokardiografiju u bolesnika s povišenim NT-proBNP-om. MSCT kao dodatna slikovna metoda korisna je slikovna metoda za objektiviziranje i kvantificiranje emfizema radi planiranja invazivne terapijske intervencije u potvrđivanju ili isključivanju bronhiektazija ili atipičnih infekcija u bolesnika sa značajnim iskašljavanjem, za otkrivanje intersticijske bolesti te u novije vrijeme niskodozni CT (*eng. low-dose CT*) za detekciju karcinoma pluća u KOPB bolesnika koji zadovoljavaju kriterije za uključivanje u Nacionalni program za rano otkrivanje raka pluća (38). Diferencijalno dijagnostički kod postavljanja dijagnoze potrebno je isključiti slijedeće bolesti: astmu, kronično zatajenje srca, bronhiektazije, tuberkulozu, obliterirajući bronhiolitis najčešće u transplantiranih (23).

Težina KOPB-a definirana je stupnjem opstrukcije dišnih putova objektivizirano spirometrijom te razredom izraženosti simptoma – ABE (39) (23). Spirometrija je zlatni standard u postavljanju dijagnoze s potrebnom potvrdom prisutnosti opstrukcije FEV1/FVC

<0.7 , tj. omjerom ograničenja protoka zraka definiranog forsiranim izdisajnim volumenom u prvoj sekundi (FEV1) i forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC). Napredovanjem saznanja o patogenezi KOPB-a od 2011. godine GOLD preporuke za klasifikaciju bolesti i liječenje uvažavaju osobitosti bolesnika te se tako i u preporukama za liječenje prihvaća koncept fenotipova u KOPB-u. Prihvaćanjem ovog koncepta liječenju se nastoji pristupiti individualno. Ranijih godina je prema GOLD preporukama klasifikacija KOPB-a bila je temeljena isključivo na nalazu spirometrije od najblažeg do najtežeg u stupnjeve težine GOLD 1, 2, 3, 4. Ubrzo se uvidjelo da na prognozu bolesti zapravo intenzivnije utječu simptomi i broj akutnih egzacerbacija te se pristupilo dodatnoj kategorizaciji bolesnika u 3 kategorije na temelju simptoma i broja akutnih egzacerbacija, ABE. Za ovu klasifikaciju potrebno je poznavati težinu i učestalost simptoma (procijenjenih mMRC skalom (engl. *modified Medical Research Council*) (40) (41) ili CAT upitnikom (engl. *COPD Assessment Test*) te broj pogoršanja (egzacerbacija) u prethodnoj godini (42) (43) (44) (Slika 4).



Slika 4. Klasifikacija KOPB-a prema GOLD preporukama, prilagođeno prema (23)

Dostupni terapijski izazovi u bolesnika s KOPB-om uz farmakološke i nefarmakološke intervencije u većine bolesnika ipak ne uspijevaju omogućiti trajno stabilno stanje bez egzacerbacija, obzirom da i uz prestanak pušenja bolest ima tendenciju napredovanja. Cilj medikamentozne terapije je poboljšati protok zraka promjenom tonusa glatkih mišića (bronhodilatatori) i suzbiti upalu (kortikosteroidi i roflumilast). Bronhodilatatori čine temeljnu

terapiju a molekule se isporučuju putem inhalera u obliku aerosola (MDI, engl. *Metered Dose Inhaler*) ili praha (DPI, engl. *Dry Powder Inhaler*) kratkog ili dugoga djelovanja kao; kratkodjelujući β 2-agonisti (SABA, engl. *Short-Acting Beta Agonist*), dugodjelujući β 2-agonisti (LABA, engl. *Long-Acting Beta Agonist*), kratkodjelujući muskarinski antagonisti (SAMA, engl. *Short-Acting Muscarinic Antagonist*) i dugodjelujući muskarinski antagonisti (LAMA, engl. *Long-Acting Muscarinic Antagonist*). Kada se kombiniraju LAMA i LABA, njihovi komplementarni mehanizmi djelotvorniji su u poboljšanju plućne funkcije i smanjenju simptoma bolesti usporedno sa odgovarajućim monoterapijama (45). Razina eozinofila u perifernoj krvi koristi se kao biomarker za predviđanje učinkovitosti inhalacijskih kortikosteroida. Dodatak inhalacijskih kortikosteroida (ICS) u fiksnoj trojnoj kombinaciji (LABA/LAMA/ICS) pokazao se da značajno smanjuje stope umjerenih ili teških egzacerbacija, poboljšava plućnu funkciju i smanjuje simptome bolesti (46) (47)(48)(49). Trojna terapija jedina je farmakološka mjera koja smanjuje mortalitet. Roflumilast kao dodatak protuupalnoj terapiji također je indiciran u stadiju bolesti sa umjerenim do teškim stupnjem opstrukcije, fenotipa kroničnog bronhitisa sa učestalim egzacerbacijama, kao i imunomodulatorna terapija azitromicinom u bivših pušača. U bolesnika sa hipoksemijom u uznapredovalom stadiju bolesti sa reperkusijom na desno srce, u smanjenju simptoma zaduhe indicirana je oksigenoterapija ili terapija neinvazivnom ventilacijom (NIV). Nefarmakološko liječenje KOPB-a temelji se na prestanku pušenja, plućnoj rehabilitaciji i umjerenoj tjelesnoj aktivnosti, cijepljenju, nutritivnoj potpori te kirurškim intervencijama. Postojeća terapija u liječenju KOPB-a još uvijek nije ciljana, usmjerena je ka lokalnom djelovanju na epitel bronha s ciljem suprimiranja upale. Cilj je kontrola postojeće upale dišnih putova kroz smanjenje broja upalnih stanica i solubilnih medijatora ili blokiranjem njihovih učinaka. Lokalni imunološki učinci kortikosteroida u dišnim putovima uključuju protuupalno aktiviranje i isključivanje ekspresije gena koji utječu na sintezu upalnih i proupalnih citokina/kemokina, receptora, enzima i adhezijskih molekula i rezultiraju smanjenim preživljenjem i angažiranjem upalnih stanica. Inhalacijski kortikosteroidi su kao preporuka za teže oblike bolesti uz češće egzacerbacije za sada limitirani brojem eozinofila u perifernoj krvi obzirom da istraživanja pokazuju nedovoljnu učinkovitost u blažim oblicima bolesti bez periferne eozinofilije (50). Uspoređujući razvoj medikamentoznog pristupa, može se reći da su bolesnici koji boluju od druge najučestalije opstruktivne bolesti pluća – astme, u boljem položaju obzirom na dostupnost terapije. Danas gotovo sa sigurnošću bolesnicima s teškim oblikom astme možemo učinkovito pomoći primjenom biološke terapije usmjerene na ključne upalne medijatore. Najčešći ciljevi su imunoglobulin E (IgE), interleukin-5 (IL-5), interleukin-4 (IL-4), interleukin-13 (IL-13), timusni stromalni limfopoetin (engl.

thymic stromal lymphopoietin – TSLP). Biološki lijekovi koji ciljaju ove molekule značajno su unaprijedili liječenje teške eozinofilne i alergijske astme. Osim toga, u tijeku su istraživanja o učinkovitosti novih terapija usmjerenih na interleukin-17 (IL-17), interleukin-33 (IL-33) i drugih, koji su također važni čimbenici u patofiziologiji astme. Prethodne studije sa mepolizumabom i benralizumabom u KOPB-u nisu dale uvjerljive rezultate u liječenju KOPB-a (51) (52). Napredak u istraživanjima medikamentoznog liječenja KOPB-a doveo je do odobrenja dupilumaba kao prve biološke terapije za ovu bolest. Ovaj lijek predstavlja značajan iskorak u liječenju KOPB-a s eozinofilnim fenotipom, otvarajući novo poglavlje u personaliziranoj terapiji ove heterogene bolesti (53) (23). Liječenje KOPB-a biološkom terapijom zasigurno će otvoriti nove poglede u medikamentoznom pristupu ovoj bolesti.

Najdramatičniji događaj u životu bolesnika s KOPB-om predstavlja akutna egzacerbacija. Egzacerbacija ili pogoršanje bolesti jest akutno nastali prekid stabilnog stanja bolesti neovisno o uobičajenim dnevnim varijacijama. Poziv su za potrebnom dodatne medikamentozne intervencije a u teškim pogoršanjima potrebno je bolničko zbrinjavanje (54). U bolesnika s učestalim egzacerbacijama uočen je brži pad plućne funkcije (55) a svako slijedeće pogoršanje zbog sistemske upale osim plućnih komplikacija dovodi do povećanog rizika od tromboembolijskog, kardiovaskularnog i cerebrovaskularnog incidenta ili smrtnosti (56) (57). Iz dosadašnjih istraživanja, poznato je da tijekom akutnih egzacerbacija KOPB-a dolazi do porasta sistemske upale kao i upale plućnog parenhima mjerene upalnim markerima (58) (59). Unatoč svim dostupnim lijekovima i intervencijama KOPB je i dalje bolest koja se teško dijagnosticira i liječi. Veliki udio otpada na skupinu prekasno dijagnosticiranih bolesnika kod kojih je plućna funkcija značajno nepovratno izgubljena. Prema dostupnim podacima gotovo svaki peti bolesnik koji boluje od KOPB-a umire u roku od jedne godine od prvog teškog pogoršanja koje je zahtijevalo hospitalizaciju (60), dok polovica umire u roku od 3,6 godina od prvog teškog pogoršanja (61).

KOPB se rijetko javlja kao samostalna bolest. Uglavnom je udružen s barem jednim, dok 50% osoba koji boluju od KOPB-a ima više od četiri komorbiditeta (62). Komorbiditeti imaju značajan utjecaj na tijek i ukupno preživljenje. Studija Ställberga u oboljelih od KOPB-a pokazala je da se tijekom praćenja u razdoblju od 8 godina učestalost komorbiditeta u postotku značajno povećala usporedno s objektiviziranim udjelom na početku uključivanja u studiju (63). Izdvojeni su slijedeći komorbiditeti; arterijska hipertenzija, kardiovaskularne bolesti, astma, GERB, depresija, šećerna bolest, osteoporoza, rak pluća. Kardiovaskularni komorbiditet

prednjačio je postotkom u intervalu praćenja, stoga autori navode važnost ranog prepoznavanja i liječenja komorbiditeta izborom adekvatne terapije.

1.3 Upala u patogenezi KOPB-a

KOPB je česta bolest u čijoj je podlozi trajna upala nastala aktivacijom urođenog i stečenog imunološkog odgovora precipitirano egzogenim inhalacijskim štetnim čimbenicima, ponajviše udisanjem cigaretnog dima (64). Ulažu se veliki naponi znanstvenika u istraživanje patofiziologije KOPB-a koja još uvijek nije potpuno jasna. Iako se zadnjih godina vidi pomak u definiranju potencijalnih proupalnih mehanizama dodatna istraživanja svakako su dobro došla. Gomilanjem saznanja o patogenezi KOPB-a promijenilo se prvotno shvaćanje o naizgled jednostavnoj bolesti uzrokovanoj udisanjem duhanskog dima ili iritanasa čija se težina procjenjivala stupnjevanjem opstrukcije u dišnim putovima. Uskoro je bilo zamijećeno da bolesnike koji boluju od KOPB-a karakterizira značajna heterogenost u kliničkoj prezentaciji, terapijskom odgovoru, padu plućne funkcije, učestalosti egzacerbacija kao i u preživljenju (65). Pokazalo se da FEV1 ne korelira sa kliničkim pokazateljima, ponajprije zbog razlika u upalnom odgovoru i stupnju oštećenja u plućnom parenhimu i dišnim putovima, a to u konačnici rezultira razlikama u kliničkoj slici, odgovoru na liječenje te brzini progresije bolesti (66). Temeljem ovih saznanja u nastavku su se definirali fenotipovi KOPB-a. U novije vrijeme veliki se naponi ulažu u traganje za molekularnim komponentama uključenim u patogenezu bolesti, kako na razini biokemijskog istraživanja tako i uz pomoć genetike a sve s ciljem da bi se definirali potencijalni geni odgovorni za nastanak KOPB-a.

Dosadašnja istraživanja upućuju na ključnu ulogu upale u etiopatogenezi KOPB-a (67). Smatra se da udisanje štetnih čestica i plinova pokreće lokaliziranu upalu u dišnim putovima koja zbog nekontroliranog upalnog odgovora dobiva kronični tijek. Obzirom da se u bolesnika s KOPB-om mogu mjeriti povišene vrijednosti upalnih stanica i proupalnih citokina u perifernoj krvi i tijekom stabilne bolesti razmišljanja idu i u smjeru da je KOPB sistemska bolest, sa sistemskim upalnim odgovorom. Dvije su hipoteze o nastanku sistemske upale: jedna podupire mehanizam „prelijevanja“ upalnih medijatora iz pluća u sistemsku cirkulaciju, a druga obrnuti mehanizam gdje se smatra da je sistemska upala ona komponenta KOPB-a koja uzrokuje poremećaje u plućima. Mehanizam takvoga odgovora još uvijek nije sasvim jasan, ali pretpostavlja se da je genetski uvjetovan. Promatrajući pridružene bolesti tj. komorbiditete, KOPB nerijetko koegzistira s bolestima u čijoj je patogenezi upala. Najčešće su to

kardiovaskularne bolesti koje su ujedno važan prediktor morbiditeta i mortaliteta u bolesnika koji boluju od KOPB-a (68).

Upala je obilježena aktivacijom urođenog i stečenog imunološkog odgovora te infiltracijom upalnih stanica i proupalnih citokina u dišne puteve i plućni parenhim (69) (70). Stanice urođenog imunološkog sustava predstavljaju najraniju obranu domaćina i čine ih neutrofili, bazofili, eozinofili, dendritičke stanice, makrofagi, mastociti i prirodne stanice ubojice (tzv. NK, engl. *Natural Killer Cells*) (71). Ispravna kaskada aktivacije urođenog imunološkog sustava predstavlja dobro posložen radni milje čija je osnovna uloga očuvati domaćina (72).

Neutrofili su najbrojniji, a upalu pojačavaju oslobađanjem citokina. Citokini se smatraju bitnim biljezima upale u bolesnika s KOPB-om mjereno iz uzoraka direktno iz dišnog ustava ili iz periferne krvi (73) (74). Povišene koncentracije interleukina-1 alfa (engl. *Interleukin-1 alpha*, IL-1 α), interleukina-1 beta (engl. *interleukin-1 beta*, IL-1 β), interleukina-6 (engl. *interleukin-6*, IL-6), interleukina-8 (engl. *interleukin-8*, IL-8) i faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor-alpha*, TNF- α) zabilježene su u bolesnika s KOPB-om usporedno sa kontrolnom skupinom zdravih ispitanika (75) (76). IL-1 uglavnom proizvodi epitel dišnih putova i makrofagi a oslobađa se zajedno s IL-6, IL-8 i TNF- α . Uzrokuje neutrofiliju, aktivaciju makrofaga i aktivaciju T limfocita (77). I pro-IL-1 α i njegov zreli oblik IL-1 α su biološki aktivni (78). Nasuprot tome, pro-IL-1 β se mora cijepati da bi bio biološki aktivan (79). IL-6 je proupalni citokin koji sintetiziraju stanice epitela dišnih putova, makrofagi i druge stanice na mjestu upale kao odgovor na stresne podražaje iz okoliša kao što je pušenje, a sudjeluje u aktivaciji, proliferaciji i diferencijaciji T limfocita (80) (81) (82). Smatra se da IL-6 snažno potiče sintezu CRP-a u jetri, a povišene koncentracije IL-6 u KOPB-u povezane su s povišenim koncentracijama CRP-a (Kolsum et al., 2009). IL-8 je multifunkcionalni kemokin uključen u upalne procese, uključujući infiltraciju neutrofila i kemotaksiju (81) (83). Izlučuje se iz makrofaga, T stanica, epitela dišnih putova i neutrofila (84). TNF α proizvode T stanice, mastociti i stanice epitela dišnih putova. Njegove glavne funkcije su kontrola stanične migracije i stimulacija lučenja drugih citokina (80). Makrofagi uklanjaju stare stanice i prezentiraju antigene T limfocitima kao stanicama stečenog imunološkog sustava (72). Limfociti T glave su stanice stečenog imunološkog sustava a osim što identificiraju specifične antigene na ciljanoj stanici i djeluju citotoksično, pomagački pokušavaju utjecati na diferencijaciju B stanica te mobiliziraju i aktiviraju druge stanice imunološkog sustava (85).

Zajedničko djelovanje ovih komponentni imunološkog sustava ima za cilj obraniti domaćina. Budući da je u bolesnika koji boluju od KOPB-a aktivator upale uglavnom trajno prisutan događaju se nepovratne promjene dišnih putova. Patomorfološke promjene kao edem sluznice, hipersekrecija sluzi, bronhokonstrikcija i fibroza u konačnici dovode do nepovratnih morfoloških promjena koje zovemo remodeliranje dišnih putova. Udruženim snagama proupalne stanice i proupalni citokini različitim interakcijama i patofiziološkim mehanizmima od kojih je dobro objašnjen oksidativni metabolizam utječu na tijek bolesti (86). Sistemska upala zajedno sa aktivacijom upalnih stanica i porastom proinflammatoryh citokina mogla bi biti vodeći uzrok endotelne disfunkcije u KOPB-u i na taj način pridonosi razvoju kardiovaskularnih bolesti u bolesnika koji boluju od KOPB-a (87). Istraživanja pokazuju povećanu količinu upalnih stanica u različitim dijelovima pluća, kao i neutrofila u sputumu i bronhoalveolarnom lavatu tijekom stabilne bolesti i egzacerbacije (88)(89). Abnormalni upalni odgovor središnji je događaj u patofiziologiji KOPB-a. Bilježi se heterogena upalna infiltracija temeljem analize sputuma koja može biti; pretežno neutrofilna, pretežno eozinofilna i pauci upalna infiltracija. Smjernice za liječenje sugeriraju da podskupine bolesnika s visokim brojem cirkulirajućih eozinofila bolje reagiraju na inhalacijske kortikosteroide, studija koja je kombinirala podatke iz 11 kliničkih studija ipak navodi da eozinofili iz krvi nisu pouzdan marker za predviđanje budućih egzacerbacija (90). U iskašljaju, biopsijama iz stijenke dišnih putova i parenhima pluća u bolesnika koji boluju od KOPB-a povišene su vrijednosti neutrofila i makrofaga. Također, u perifernoj krvi bolesnika koji boluju od KOPB-a su povišene vrijednosti parametara sistemske upale: neutrofila, CRP-a, fibrinogena (91) (92) (87). Aktivacija neutrofila i makrofaga dodatno oslobađa proteinaze (neutrofili luče neutrofilne elastaze, a makrofagi matriks metaloproteinaze) koje nadmašuju aktivnost antiproteaza što dovodi do razgradnje elastina i drugih elemenata potpornog tkiva pluća (93). Vrijednosti ovih parametara često koreliraju s težinom bolesti a osim što su im vrijednosti u korelaciji s akutnim pogoršanjima bolesti (egzacerbacijama) često su i pokazatelj utjecaja pridruženih komorbiditeta. Iako bi se znanje o važnosti eozinofila moglo pokazati korisnim, većina egzacerbacija ipak je posredovana neutrofilnom upalom (94). Stupanj neutrofilne upale korelira s važnim kliničkim ishodima kao što su stopa pada plućne funkcije i događaji egzacerbacije (95). U akutnoj egzacerbaciji uz CRP povećava se i razina fibrinogena čime se povećava rizik od tromboembolije (96). Kronična sistemska upala u bolesnika s KOPB-om čini se da je začarani krug (76) (97) (98).

1.4 ACE2 i KOPB

Obzirom na činjenicu da poremećena regulacija aktivacije upale ima značajnu ulogu u nastanku i razvoju KOPB-a, a patogeneza je još uvijek nedovoljno razjašnjena, nameće se ideja o ulozi signalnog puta RAAS i proteina ACE2 u nastanku bolesti. Postoji dokaz uključenosti RAAS-a u patogenezu brojnih kroničnih upalnih procesa koji su ujedno komorbiditeti u KOPB-u. ACE2 kao dio RAAS kaskade postavio se kao komponenta uključena u patogenezu ovih sistemskih upalnih procesa, ponajprije KOPB-a. RAAS u plućima doprinosi normalnoj plućnoj funkciji i razvoju (99) (100), dok abnormalne vrijednosti pojedinih komponenti toga sustava mogu dovesti do poremećaja.

KOPB je bolest koja primarno zahvaća pluća, a karakterizirana je ne samo lokalnom, već i sistemskom upalom koja je odgovorna za pridružene ekstrapulmonalne i kardiovaskularne komorbiditete. Slabo regulirani RAAS povezuje se s nastankom kroničnih plućnih bolesti a autori navode da bi se djelovanjem na RAAS moglo terapijski utjecati na tijek ovih bolesti (100) (101). U skladu s time, lijekovi koji ciljaju na RAAS, inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors*, ACEi) i antagonisti angiotenzinskih II receptora, (engl. *Angiotensin II Receptor blockers*, ARBs), imaju povoljan učinak i na ishod bolesti u bolesnika koji boluju od KOPB-a (102) (103) (104) (105) (106).

Pluća su mjesto ispreplitanja aktivnosti lokalnog (tkivnog) i sistemskog RAAS-a. Lokalni RAAS djeluje autonomno čime neovisno regulira patofiziološke procese zasebno za svaki organ pa tako i pluća (107). Bolesnici s KOPB-om često pokazuju poremećaje u sustavu RAAS, a hipoksija se smatra glavnim razlogom toga (108). Aktivacija lokalnog RAAS-a kao odgovor na alveolarnu hipoksiju djeluje stimulirajući na proupalne čimbenike u plućima, IL-6, TNF- α , citokin monocitni kemotaktični protein-1, (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCP-1). Oni imaju imunomodulatorni učinak na T-limfocite čime pridonose ozljedi u tkivu pluća udruženoj s KOPB-om (109).

Najproučavaniji katalitički spoj RAAS u plućima je ACE, metaloproteinaza za koju se odavno zna da joj je koncentracija u plućima prilično visoka, obzirom da se stvara u plućnom tkivu. ACE je odgovoran za stvaranje Ang II, biološki aktivnog peptidnog hormona.

Ang II u plućima potiče bronhokonstrikciju, vazokonstrikciju, proliferaciju fibroblasta, ekspresiju proupalnih citokina i staničnu apoptozu, te na sve ove načine indirektno utječe na tkivnu ozljedu. Čini se da je Ang II ključni posrednik ozljede pluća i pokretač apoptoze alveolarnih epitelnih stanica, te putem receptora AT1, koji su vrlo zastupljeni unutar tkiva

pluća, kontrolira i rast plućnih fibroblasta. Vezanjem Ang II na njegov receptor AT1R aktivira se kaskada sa čimbenicima rasta koji potiču proliferaciju stanica u hipoksičnom miljeu što rezultira anaerobnim metabolizmom sa oksidativnim stresom i oslobađanjem slobodnih radikala kisika. Proizvodnja slobodnih radikala kisika posredovano putem AT1R, u konačnici uzrokuje mitohondrijsku disfunkciju i disfunkciju endotela što predstavlja sastavni dio patofiziologije KOPB-a (110) (111). Slobodni radikali kisika sudjeluju i u oštećuju molekule DNK što u konačnici, u jednog dijela bolesnika s KOPB-om, dovodi i do pokretanja malignog procesa što ide u prilog do sada potvrđenoj koegzistenciji KOPB-a i karcinoma pluća (112) (113) (114) (115). Aktivacijom Ang II povećava se oslobađanje proupalnih citokina i tako posredno potiče sistemsku upalu. Pokazalo se da MCP-1 ekstrahiran iz alveolarnih makrofaga, kao odgovor na akutnu alveolarnu hipoksiju, aktivira mastocyte izazivajući tako sistemsku upalu (116). Zna se i da razvoju KOPB-a doprinose angiotenzinom II posredovano gomilanje reaktivnih kisikovih spojeva, (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), mitohondrijska disfunkcija i poremećena redoks signalizacija. Vezanjem Ang II na AT1R osim što će se pokrenuti upalna kaskada i aktivirati signalni put nuklearni faktor kappa B, (engl. *Nuclear Factor Kappa B*, NF-Kb), signalni put STATs (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*, STATs) i signalni put MAPK, (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK) stimulira se proizvodnja slobodnih kisikovih spojeva tj. ROS-a inducirajući staničnu smrt – apoptozu (117).

Nizvodna komponenta u kaskadi, ACE2, je enzim koji je osnovna komponenta druge važne osovine RAAS-a, a neutralizira štetne učinke Ang II tako što uravnotežuje njegove razine i ima fiziološki suprotan učinak. Oba su enzima značajno zastupljena u plućima, kao i njihovi receptori (118). Eksperimentalni modeli sugeriraju da plućni ACE2 štiti od promjena nastalih u sklopu KOPB-a (119). Xue i suradnici su na eksperimentalnim modelima štakora koji boluju od KOPB-a proučavali učinak ekspresije ACE2 na upalni odgovor i funkciju pluća. Pokazali su da je veća ekspresija ACE2 u epitelnim stanicama dišnih putova povezana sa značajnim poboljšanjem plućne funkcije i smanjenom razinom proupalnih citokina, poput TNF α , IL-8, IL-2 i IL-1 β . Ovim istraživanjem došlo se i do saznanja da je ekspresija glasničke mRNA (engl. *messenger Ribonucleic Acid*, mRNA) za angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE2) značajno smanjena u plućima štakora koji boluju od KOPB-a u usporedbi s ekspresijom u štakora divljeg tipa (119). Sve ovo ukazuje da bi potisnuta regulacija ACE2 i neravnoteža ACE/ACE2 mogla imati ulogu u patogenezi i progresiji KOPB-a, no potrebni su dodatni naporima istraživača kako bi se ovo razjasnilo. U konačnici, ACE2 štiti pluća od ozljede. Smatra se da bi ACE2 mogao

biti ključni oponent klasičnom RAAS-u obzirom da metabolizira Ang II u mnogo povoljniji Ang 1-7. U KOPB-u prisutna neravnoteža vazoaktivnih komponenti sustava RAAS, a terapijsko pomicanje ravnoteže prema ACE2 daje dobre učinke na ishode liječenja (100) (120).

Renin-angiotenzin-aldosteronski sustav (RAAS), ovisno o fiziološkim uvjetima, može biti aktiviran ili reguliran putem dvaju funkcionalno suprotnih mehanizama. Klasični put, koji uključuje ACE/angiotenzin II/AT1R osovinu, povezan je s vazokonstrikcijom, staničnom proliferacijom, hipertrofijom organa, retencijom natrija i stimulacijom oslobađanja aldosterona. S druge strane, proturegulacijski i vazodilatacijski mehanizam temelji se na ACE2/angiotenzin-(1-7)/Mas receptorom putu. Ova osovina ima ključnu ulogu u poticanju vazodilatacije, inhibiciji stanične proliferacije i hipertrofije, te pokazuje izražene kardioprotektivne i nefroprotektivne učinke. Sukladno tome, posljedice aktivacije ACE/AngII/AT1R signalnog puta mogle bi se smanjiti djelovanjem antagonističkog ACE2/Ang1-7/MasR puta (121). Favorizira se signalni put ACE2/Ang(1-7)/Mas čija je ACE2 glavna komponenta. ACE2 se putem ovog signalnog puta nameće kao glavni oponent sustava RAAS jer poništava proupalni, vazokonstriktorni, i profibrotički učinak aktivacije RAAS-a (122). Zbog sposobnosti RAAS da posreduje u regulaciji intrapulmonalnog tlaka, upali, fibrozi kao i njegove ključne uloge u proliferaciji plućnih stanica i apoptozi, neodgovarajuća funkcija RAAS povezuje se uvelike s patologijom pluća (100). Kronična izloženost duhanskom dimu i drugim štetnim tvarima glavni je čimbenik za razvoj KOPB-a. Predložen je mehanizam kojim bi RAAS mogao biti uključen u ovaj proces djelovanjem putem nikotina iz duhanskog dima. Nikotin indirektno sudjeluje u oslobađanju renina iz bubrega, gomilanju i angiotenzina II s vazokonstriktornim i proupalnim učinkom (123). Aloufi je u svom istraživanju 2021. godine, ukazao da kronična izloženost duhanskom dimu povećava ekspresiju proteina ACE2 u plućima (124). Iako još nema čvrstih dokaza koji potvrđuju ulogu ACE2/Ang1-7/Mas u patogenezi KOPB-a, zna se ipak da aktivacija ovoga puta ima protuupalne i antifibrotičke učinke u različitim tkivima. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dodatno ispitao ranije predložen mehanizam kojim bi se putem aktivacije signalnog puta ACE2/Ang1-7/Mas potisnula proupalna osovina ACE/AngII/AT1R i time moglo utjecati na poremećaj ravnoteže signalizacije RAAS-a koji u konačnici dovodi do nastanka kronične upale u plućima (125).

1.5 Polimorfizmi u genima za ACE2

Jedan od potencijalnih pristupa ispitivanja mehanističke uloge ACE2 u nastanku i razvoju KOPB-a je ispitivanje genske podloge kroz asocijacijske studije uporabom različitih polimorfničkih biljega. Asocijacijske studije primjenjuju se u istraživanju genske podloge bolesti

u smislu određivanja potencijalne predodređenosti za razvoj bolesti. Povezanost specifičnih polimorfizama nekih gena s nastankom i razvojem KOPB-a već je duže vrijeme poznata (126). Prisutnost polimorfničkih varijanti specifičnih gena u nekoj populaciji, osim što omogućava utvrđivanje genetičke povezanosti, može utjecati i na ekspresiju gena od značaja i tako potencijalno utjecati na odgovor pluća u borbi protiv čimbenika koji omogućavaju nastanak tih bolesti. Za jedan od polimorfizama koji je predmet našeg istraživanja, *ACE2* rs2285666 zna se da potencijalno može utjecati na ekspresiju gena putem alternativnih mehanizama spajanja (127) (128). Ljudski genom sastoji se od 23 para kromosoma, približno dvije kopije od ukupno tri milijarde parova baza. Razlike između dvije jedinke su uglavnom malene, obično jedna razlika na 1000 parova baza. Najveći broj ovih razlika, tj. polimorfizama, javlja se kao polimorfizam u jednom nukleotidu odnosno promjena samo jedne baze, tzv. SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*). Ovaj tip genskih varijacija često su povezani s mnogim patološkim stanjima (129).

Pojam polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) podrazumijeva promjenu pojedinačne nukleotidne baze u drugu na specifičnoj lokaciji što za posljedicu ima promjenu slijeda nukleotida u samom genu (molekuli DNA) (130). Budući da je ljudski genom diploidan jer nasljeđujemo kromosome oba roditelja, u odabranom SNP-u moguće su heterozigotne ili homozigotne alelne kombinacije (131). Obzirom da su najčešći oblik genetskih varijacije u genomu, ove točkaste mutacije mogu imati različite funkcionalne posljedice ovisno o njihovoj učestalosti i poziciji u genomu. SNP-ovi se na temelju njihove uočene učestalosti u općoj populaciji dijele na učestale varijante (koje se pojavljuju u populaciji s frekvencijom većom od 1%) i manje učestale varijante (koje su rjeđe, ali mogu imati bitan utjecaj) (132). Funkcionalni SNP-ovi odgovorni su za razlike u fenotipu i promjene u strukturi i funkciji proteina čime mogu utjecati i na biološke procese (133). U ljudskom genotipu ovakvih je funkcionalnih točkastih mutacija od 3-5 % (134). Razumijevanje SNP-ova ključno je za istraživanje genetske predispozicije, farmakogenetiku i populacijsku genetiku obzirom da mogu djelovati na tijek i ishod aktivacije različitih signalnih puteva u organizmu, te samim tim i na pojedinačne razlike u imunološkom odgovorima jedinki.

Osim kodirajućih regija odgovornih za nastanak proteina, pa tako i molekule *ACE2*, veliki dio gena *ACE2* čine nekodirajući slijedovi. Tragajući za genetskim faktorima uključenima u patofiziologiju nekih bolesti već je ranije otkriveno nekoliko polimorfničkih biljega unutar gena *ACE2* koji se povezuju sa rizikom za nastanak arterijske hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti (135) (136) (137). Zna se da samo 15-20% aktivnih pušača oboli od

KOPB-a, a razlog tome još uvijek nije dovoljno jasan. Pretpostavlja se da je u podlozi ovog fenomena genetska predispozicija za razvoj bolesti, no još uvijek ne postoje čvrsti dokazi o mehanizmu povezanosti nastanka KOPB-a, izloženosti duhanskom dimu i genetičkoj podlozi tih procesa. Studije povezanosti cijelog genoma usmjerene na fenotipove bolesti definirane spirometrijom sugeriraju da je genetska nasljednost KOPB-a umjerena (138). Mutacija u genu *SERPINA 1* koja uzrokuje KOPB u sklopu nasljednog nedostatka alfa -1 antitripsina najjasnije je do sada objašnjen mehanizam monogenske uloge u patofiziologiji KOPB-a (139). Nedostatak antitripsina $\alpha 1$ zabilježen je u 1-2% bijele populacije bolesnika s KOPB-om (140). Teški emfizem određen nasljeđem poznat je u Ehlers Danlosovom sindromu i telomeropatijama (141) (142) a jedna od najvećih studija koja je uključivala preko 50000 parova blizanaca ukazala je nasljednost KOPB-a procijenjenu na preko 50% (143). Do danas je poznato još nekoliko gena koji bi se mogli povezati sa sklonošću za razvoj KOPB-a (144) (126).

Poznato je da u bolesnika koji razvijaju KOPB postoji nekoliko genetskih polimorfizama u enzimima koji aktiviraju ili deaktiviraju kancerogene tvari duhanskog dima (145). Moglo bi se pretpostaviti da su upravo polimorfizmi unutar tih gena odgovorni za nastanak i tijek bolesti jer mogu izmijeniti rizik kroničnih pušača za razvoj KOPB-a poremećenim odgovorom na učinke upale i reguliranjem tumor-supresorskih gena (146) (147) (148). Polimorfizmi u genu za matriksnu metaloproteinazu 12 (engl. *Matrix Metalloproteinase-12*, *MMP-12*) mogu biti povezani s razvojem emfizema i KOPB-a. Gen *MMP-12* kodira protein zvan i makrofagna elastaza, koji kao enzim razgrađuje elastin i druge komponente izvanstaničnog matriksa te igra ključnu ulogu u remodeliranju tkiva i upalnim procesima (149) (150). Polimorfizmi u genu za hedgehog interakcijski protein (engl. *Hedgehog-Interacting Protein*, *HHIP*) koji kodira protein inhibitor Hedgehog signalnog puta, ključnog za razvoj i regeneraciju tkiva uključujući plućno tkivo, povezani su sa smanjenom plućnom funkcijom i egzacerbacijama (151) (152). Ekspresija gena za podjedinicu nikotinskog acetilkolinskog receptora (engl. *Cholinergic receptor nicotinic alpha 3/5*, *CHRNA3/5*) povezana je s težinom bronhoopstrukcije i emfizema (151) (153). Polimorfizmi u genu za glutation S-transferazu (engl. *glutathione S-transferaze*, *GST*) koji predstavlja enzim čija je ključna uloga u organizmu u neutralizaciji kisikovih reaktivnih spojeva, zna se da sudjeluju u nastanku KOPB (154)(155). Otkako je prisutna dostupnost sekvenciranja cijelog genoma, bolja dostupnost asocijacijskih studija i nove metode za analizu podataka o genetskim varijacijama možemo reći da je danas poznato preko 20 lokusa povezanih s KOPB-om, a brojne studije još su u tijeku (156). Iako niti jedan od utvrđenih gena nema veliki

individualni učinak, njihova međusobna interakcija unutar složene genetske mreže može značajno doprinijeti razvoju bolesti.

O polimorfizmima *ACE2* u bolesnika s KOPB –om malo se zna. Povećana je ekspresija *ACE2* u plućima bolesnika s KOPB-om, kao i u pušača. Povezanost specifičnih polimorfizama *ACE2* i rizika za razvoj KOPB-a još nije u potpunosti razjašnjena. Polimorfizmi u *ACE2* mogu utjecati na njegovu ekspresiju i funkciju, što u konačnici može modulirati upalni odgovor i remodeliranje u plućnom parenhimu što predstavlja osnovne patofiziološke događaje u nastanku KOPB-a. Dosadašnja istraživanja sugeriraju da *ACE2* može imati zaštitni učinak protiv oštećenja plućnog parenhima proupalnim mehanizmima, no genetski faktori koji ovo reguliraju za sada još nisu poznati. Za polimorfizam rs2285666 veže se uloga u regulaciji ekspresije *ACE2* u plućima tijekom COVID 19 infekcije te u bolesnika s hipertenzijom, no nedostaje studija koje bi opisale njegovu ulogu u patogenezi KOPB-a. Većina sada dostupnih studija bazira se pretežno na ulozi *ACE2* u oboljelih od COVID 19. Obzirom na različite ishode u liječenju virusne upale pluća, uloga proteina *ACE2* razmatrana je u kontekstu receptora, ali i kao komponente RAAS sustava u sklopu koje bi utjecao na sistemski upalni odgovor. Pretpostavlja se da vezanje virusa SARS-CoV-2 na *ACE2* receptor vodi ka manjku aktivnog *ACE2*, što utječe na poremećaj regulacije tkivnog RAAS-a a što u konačnici dovodi do upale i trajnog oštećenja tkiva kao posljedica viška angiotenzina II. Kako je neregulirani lokalni RAAS povezan s produljenim oslobađanjem katalitički aktivnog mjesta *ACE2* u cirkulaciji, moguće je da se na taj način može objasniti produljenu COVID 19 bolest (157). Ozljeda pluća u COVID 19 bolesti i mehanizam ovog patofiziološkog procesa pojašnjen je u radu Gintonia i sur. Vezanjem SARS-CoV-2 virusa za aktivno mjesto na proteinu *ACE2* započinje upala kaskada uz snižene vrijednosti *ACE2* i povišene vrijednosti Ang II (158). Povišene vrijednosti Ang II stimuliraju otpuštanje upalnih citokina što vodi ka lokalnoj upali (159). Vazodilatacija plućne vaskulature utječe na otpuštanje *ACE* u intersticijski prostor što kaskadnom aktivacijom Ang II potiče infiltraciju i aktivaciju leukocita (160). Posljedična pojačana stimulacija signalnog puta AngII/ATR1 uz proizvodnju ROS-a u konačnici uzrokuje sustavnu upalu s gomilanjem proupalnih čimbenika; TNF-alpha, interleukina-6 i CRP-a (161) (162). Uočeno je da brojni pojedinačni polimorfizmi u genu za *ACE2* mogu imati utjecaj na infektivnost domaćina te ukupno preživljenje od COVID 19 bolesti (163). Neki polimorfizmi unutar *ACE* gena pokazuju različit učinak u aktiviranju neutrofila, monocita/makrofaga, NK stanica i pomoćničkih limfocita T čime aktivno sudjeluju u pojačavanju ili smanjivanju upalnog odgovora tzv. citokinske oluje (159) kao i kataliziranje pretvorbe Ang II u Ang 1-7 čime se direktno utječe i

na lokalnu i sistemsku ozljedu tkiva (128) (164). Akcilar i suradnici objavili su rad kojim su nastojali povezati genetski utjecaj na ishod od COVID 19 infekcije. Komparirajući skupinu zaraženih COVID 19 infekcijom sa i bez afekcije pluća a promatrajući polimorfizme unutar gena *ACE2* (SNP G8790A tj. rs2285666) objavili su rezultate u kojima navode kako se ovaj polimorfizam pokazao kao prediktor za veću učestalost afekcije pluća u zaraženih COVID 19 infekcijom (165). Rezultati znanstvenih istraživanja pokazali su da ispitanici koji imaju KOPB, kao komorbiditet, ne pokazuju povećani rizik od infekcije SARS-CoV-2 virusom, niti KOPB povećava rizik za razvoj dugotrajnih posljedica COVID -19 bolesti (166) (167). Ipak, pokazalo se da osobe oboljele od KOPB-a imaju blago povećan rizik za moguću hospitalizaciju pri zarazi SARS-CoV-2, te nešto veći rizik za prijam u jedinice intenzivnog liječenja i povećani mortalitet (168).

Dosadašnja istraživanja u KOPB bolesnika ispitivala su ulogu polimorfizama na razini gena *ACE*, a rezultati studija su oprečni. Nekoliko studija povezuje utjecaj polimorfizama gena *ACE* s rizikom za nastanak KOPB-a u pušača (169)(170) (171), drugi navode epigenetske faktore (različita ciljana populacija) diljem svijeta kao prediktor za nastanak KOPB-a na razini polimorfizma *ACE* (172), a neki potpuno osporavaju utjecaj polimorfizama unutar gena *ACE* na rizik za nastanak KOPB-a (172) (173). Kada uključimo arterijsku hipertenziju kao najčešći komorbiditet u oboljelih od KOPB-a čini se da je nastanak hipertenzije u ovih bolesnika ipak određen polimorfizmima unutar gena *ACE* (174). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se istražila ekspresija gena *ACE2* te utvrdila eventualna uloga polimorfizama *ACE2* u razvoju i tijeku KOPB-a, svakako uz buduće genetičke i funkcionalne studije uključujući genomske asocijacijske studije (GWAS) a rezultati naše studije mogli bi pripomoći u tome.

1.6 Svrha rada

Obzirom na činjenicu da je regulacija aktivnosti gena/proteina *ACE2* povezana s promjenom aktivnosti upalnih procesa, a neregulirana upala ima značajnu ulogu u etiopatogenezi KOPB-a, za pretpostaviti je da bi se prisutnost pojedinih polimorfizama smještenih u genu *ACE2* mogla povezati s mehanizmom nastanka i razvoja bolesti. Naime, pretpostavili smo da bi učestalost testiranih polimorfizama unutar gena *ACE2* mogli povezati s podložnošću za razvoj KOPB-a.

Cilj ovoga rada je ispitati postoji li povezanost polimorfni biljega smještenih u genu *ACE2* s nastankom i razvojem KOPB-a, te ispitati njihov utjecaj na ekspresiju gena *ACE2*.

Također, cilj je ispitati povezanost polimorfizama unutar gena *ACE2* s fenotipskim obilježjima bolesti i parametrima plućne funkcije.

Ocjena rada
u tijeku

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

2.1 Ciljevi istraživanja

2.1.1 OPĆI CILJ

Opći cilj ovog istraživanja je doprinijeti boljem razumijevanju do sada neistražene uloge gena *ACE2* u molekularnim mehanizmima uključenima u razvoj i progresiju KOPB-a.

2.1.2 SPECIFIČNI CILJEVI

- 1) Odrediti učestalost odabranih polimorfni biljega gena *ACE2* u skupini ispitanika s KOPB-om i zdravih ispitanika
- 2) Odrediti razinu ekspresije gena *ACE2* u perifernim nuklearima bolesnika s poznatim genotipom koji boluju od KOPB-a
- 3) Odrediti povezanost genotipa sa serumskim koncentracijama proupalnih citokina
- 4) Odrediti povezanost koncentracije općih upalnih biljega (CRP, fibrinogen, neutrofili) s analiziranim polimorfizmima
- 5) Odrediti povezanost testiranih polimorfizama s fenotipskim obilježjima KOPB-a (plućna funkcija)

2.2 Hipoteza

Polimorfizmi unutar gena *ACE2* povezani su s podložnošću za razvoj KOPB-a i težinom bolesti.

Ocjena rada
u tijeku

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

Ispitanici uključeni u ovo istraživanje dio su dva istraživačka projekta (HRZZ-IP-06-2016-1441 i HRZZ-IP-2014-09-1247). Istraživanje je opservacijsko (engl. *case control*), anonimno, a Etička povjerenstava KBC Zagreb, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i Zavoda za transfuzijsku medicinu Zagreb odobrila su istraživanje. Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak i evidentirani su pod šifrom poznatom samo glavnom istraživaču čime je zajamčena njihova anonimnost.

Istraživanje obuhvaća skupinu od 313 ispitanika s dijagnozom KOPB-a (Klinike za plućne bolesti Jordanovac, KBC Zagreb), te skupinu od 263 zdravih ispitanika (Zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb) koji čine kontrolnu skupinu podudarnu po dobi i spolu s bolesnicima, različitog pušačkog staža.

Bolesnici s KOPB-om uključeni u istraživanje su na optimalnoj medikamentoznoj terapiji prema aktualnim smjernicama i dobroj kliničkoj praksi. Uključni kriteriji; dijagnoza KOPB-a prema važećim GOLD smjernicama iz 2017. godine, stabilna faza bolesti, dob starija od 40 godina, minimalno 10 pušačkih godina, potpisan informirani pristanak. Isključni kriteriji; nemogućnost izvođenja testova plućnih funkcija, aktivna maligna bolest, akutno pogoršanje KOPB-a.

Prikupljeni su relevantni demografski podaci prikazani u poglavlju Rezultati. U studiju su uključene karakteristike studijske populacije, uključujući stadij KOPB-a prema GOLD kriterijima (1-4), spol, dob pri postavljanju dijagnoze, pušački status te procjenu kliničkih parametara, među kojima su plućni funkcijski testovi. Istraživanje je provedeno na skupini ispitanika s dijagnosticiranim KOPB-om, uz komparaciju s kontrolnom skupinom zdravih ispitanika bez KOPB-a

3.2 Metode

3.2.1 Spirometrija

Za objektivizaciju parametara plućne funkcije koristili smo spirometriju i krivulju protok - volumen izvršenu na uređaju MasterScreen Pnemo (Jager, Njemačka) provedenu prema kriterijima Američkog torakalnog društva/Europskog respiratornog društva (ATS/ERS).

Uz prethodnu poduku ispitanika rađena su najmanje tri izvođenja standardnom tehnikom. Kao vrijednost promatranog pokazatelja izabrana je najviša vrijednost izražena kao postotak od očekivanja vrijednosti, za FVC i FEV1 prema važećim smjernicama. Svim je ispitanicima učinjen farmakodinamski test salbutamolom (Ventolin® Pliva). Spirometrija je ponovljena 20 minuta nakon udisanja 400 mcg salbutamola (četiri udaha). Reverzibilnost bronhoopstrukcije je procijenjena na FEV1, uz kriterij pozitivnosti za 12% i 200 ml u odnosu na početnu vrijednost. Ispitanici sa pozitivnom farmakodinamskim testom nisu uključeni u istraživanje. Korištene su postbronhodilatacijske vrijednosti svih navedenih spirometrijskih parametara a dobivene vrijednosti izražene u postotcima. Procijenjeni su slijedeći parametri plućne funkcije: FEV1, FVC, FEV1/FVC %, PEF. Ograničenje protoka zraka klasificirano je prema forsiranom ekspiriju u prvoj sekundi, vrijednosti FEV1. Odnos FEV1/FVC nakon primjene bronhodilatatora manji od 0.7 smatrao se dijagnostičkim kriterijem ograničenja protoka zraka, a ograničenje protoka zraka stupnjevano je prema GOLD kriterijima, kao GOLD 1 ($ppFEV1 \geq 80$), GOLD 2 ($80 \leq ppFEV1 < 50$), GOLD 3 ($50 \leq ppFEV1 < 30$), GOLD 4 ($ppFEV1 < 30$).

3.2.2 Uzorci periferne krvi

Iz uzoraka periferne krvi izolirana je ukupna genomska DNA i provedena je analiza genotipizacije u obje skupine; u bolesnika s KOPB-om i kontrolne skupine zdravih ispitanika, dok je analiza koncentracije upalnih biomarkera (neutrofili, CRP, fibrinogen) i citokina provedena na serumima u skupine bolesnika s KOPB-om. Molekularne metode izolacije genomske DNA i asocijacijske studije povezanosti polimorfnih biljega sa sklonošću za razvoj KOPB-a provedene su na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, na Zavodu za molekularnu medicinu.

Uzorci periferne krvi 5 ml, prikupljeni su u epruvete s antikoagulansom EDTA, te pohranjeni na 4°C. Isti dan krv je obrađena u svrhu izolacije seruma na način da je centrifugirana na brzini od $1620 \times g$, 10 min. Supernatant (serum) je alikvotiran i spremljen na -20°C, do funkcionalne analize. Preostali talog/sediment koji, sadrži leukocite, podijeljen je na dva dijela, za potrebe izolacije DNA i pohranjen na -20°C, do izolacije. Drugi dio koristio se za izolaciju RNA isti dan. Određivanje neutrofila se odvijalo po načelu metode protočne citometrije na hematološkom brojaču tvrtke Sysmex (Sysmex XN-1000), Sysmex Corporation Kobe, Japan. Koncentracija CRP-a se određivala imunoturbidimetrijski na biokemijskom analizatoru tvrtke Roche (Cobasc501), Roche Diagnostics, Njemačka. Funkcionalna koncentracija fibrinogena mjerena je modificiranom metodom po Claussu na autoriziranom

optičkom koagulometru tvrtke Siemens (BCS-XP), Siemens Healthcare Diagnostics, Njemačka.

3.2.3 Izolacija genomske DNA metodom isoljavanja

Za potrebe izdvajanja genomske DNA koristila se metoda isoljavanja. Miješanjem krvi s puferom za lizu eritrocita (osmotska liza stanica) uklonjeni su eritrociti iz uzorka, te razgrađeni leukociti iz kojih se oslobodila genomska DNA. Uzorci krvi prikupljeni su u epruveti s antikoagulansom EDTA te pohranjeni na -20°C . Nakon što se krv otopila na sobnoj temperaturi, jednom volumenu krvi dodan je trostruki volumen pufera za lizu eritrocita (engl. *Red Cell Lysis Buffer*, *RCLB*: 10mM Tris-HCl, 5mM MgCl_2 , 5mM NaCl, pH 7,6, steriliziran autoklaviranjem, čuvan na $+4^{\circ}\text{C}$) nakon čega se smjesa prebacila na led i inkubirala 15 minuta. Uzorak je centrifugiran, a dobiveni sediment, koji je sadržavao ostatke liziranih eritrocita, pažljivo je dekantiran. Preostali sediment leukocita višekratno je ispran s novom količinom *RCLB*-a. Na isprani sediment dodan je pufer SE (75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA 2, pH 8, steriliziran autoklaviranjem, čuvan na $+4^{\circ}\text{C}$), 10% otopina SDS-a (natrijev laurilsulfat) i proteinaza K koncentracije 0,1 mg/mL. Dobiveni sediment odvojen je od dna epruvete i inkubiran preko noći na 37°C u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, smjesa je pomiješana sa 1/3 volumena 5 M NaCl (750 μL), u svrhu taloženja proteina. Smjesa je centrifugirana (Eppendorf centrifuga 5403, Njemačka) 15 minuta na 800 g, pri sobnoj temperaturi, a dobiveni supernatant dekantiran i ponovno centrifugiran pod istim uvjetima. Pročišćeni se sediment potom pomiješao sa istim volumenom 2-propanola (Kemika, Hrvatska), a istaložena DNA staklenom kukicom prenešena u ledeni 70%-tni etanol. Tako isprana DNA prenesena je u TE pufer (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM Na_2EDTA) i pohranjena na $+4^{\circ}\text{C}$. Kvaliteta izolirane DNA ispitivana je elektroforezom u gelu agaroze, a koncentracija DNK određena metodom spektrofotometrije, na UV/VIS spektrofotometru.

3.2.4 Reakcija lančanog umnožavanja genomske DNA (engl. polymerase chain reaction - PCR) primjenom specifičnih proba (TaqMan, Applied Biosystems)

Učestalost pojedinih genetičkih biljega u genima od interesa analizirana je reakcijom lančanog umnožavanja genomske DNA (engl. PCR, *polymerase chain reaction*) i to primjenom specifičnih proba (TaqMan, Applied Biosystems). PCR je metoda umnažanja željenog odsječka

DNA u uvjetima *in vitro*, pomoću termostabilnog enzima, polimeraze Taq-DNA i dvije konstruirane oligonukleotidne početnice. Reakcija se odvijala u tri koraka: 1. proces denaturacije kalupa DNA, 2. sparivanje početnica (engl. *annealing*) i 3. sinteza komplementarnih lanaca DNA. Probe TaqMan su jedan od primjera tzv. hidrolizirajućih proba koje koriste 5'-3' egzonukleaznu aktivnost enzima polimeraze Taq, što omogućava cijepanje dvostruko obilježene komplementarne probe prethodno vezane za kalup DNA. Hibridizirajuća proba je oligonukleotidini odsječak visoko komplementaran kalupu DNA i obilježen fluorescencijskom probom (engl. *reporter*) i prigušujućom probom (engl. *quencher*). One se nalaze na suprotnim krajevima probe i kad su u međusobnoj blizini, blizina prigušivača onemogućava fluorescenciju reporterske boje. U ovom radu uzorci su genotipizirani metodom alelne diskriminacije, korištenjem proba TaqMan, koje omogućavaju istovremeno umnažanje specifičnih alela metodom lančane reakcije polimeraze i njihovu detekciju. Kod genotipizacije uzoraka DNA u ovom istraživanju, u reakcijsku smjesu unošene su obilježene probe koje su specifične za oba alela koja testiramo na određenom lokusu. U ovom radu analizirani su tzv. točkasti polimorfizmi – SNP-ovi. Polazi se od pretpostavke da uzorak genomske DNA svakog ispitanika može biti ili heterozigot ili jedan odnosno drugi homozigot. Komercijalno dostupni esaji su dizajnirani tako da sadrže specifične početnice za odsječak DNA od interesa i visoko komplementarne probe za jedan i drugi alel. Ukoliko je uzorak ispitanika homozigot, tada će analiza alelne diskriminacije pokazati da je u krajnjem očitavanju ukupne fluorescencije na kraju reakcije PCR (engl. *end-point analysis*) instrument očitao samo fluorescenciju karakterističnu za taj alel. U slučaju kada je ispitanik heterozigot, krajnja analiza očitat će razinu fluorescencije specifične za oba alela.

3.2.5 Izolacija RNA iz stanica periferne krvi i RT-PCR

Za potrebe ispitivanja razine ekspresije gena *ACE2* korištena je RNA izolirana iz stanica perifernih mononukleara. U tu svrhu koristili smo komercijalno dostupan kit za izolaciju RNA iz stanica (Qiagen, SAD), prema uputi proizvođača. Izolirana RNA se metodom reverzne transkripcije prevela u cDNA koja se koristila za određivanje razine ekspresije gena *ACE2*. Korištena je komparativna CT metoda kvantitativnog PCR-a, u stvarnom vremenu (engl. *real-time quantitative PCR*, RT-qPCR) sa specifičnim hidrolizirajućim, TaqMan, probama, prema uputi proizvođača (Applied Biosystems). Komparativna CT metoda ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta\Delta CT$) je najčešća metoda analize podataka kod relativne kvantifikacije produkata. Ova metoda podrazumijeva korištenje ciljnog gena i endogene kontrole. Kao endogena kontrola koristio se

aktin, uz pripadajuće TaqMan analize (engl. *assay*) (Applied Biosystem) za ACE2 (Hs01085333_m1) i Aktin (Hs99999903_m1). U procesu kvantifikacije, najprije se gen od interesa (GOI), tj. njegova CT vrijednost, normalizira u odnosu na endogenu kontrolu (EK) u istom uzorku čime se dobiva ΔCT vrijednost. Dobivena ΔCT vrijednosti za uzorak se zatim uspoređuju sa ΔCT vrijednostima kalibratora te se tako dobije $-\Delta\Delta CT$ vrijednost. Zatim se $-\Delta\Delta CT$ vrijednost uvrsti u jednadžbu (omjer 30 količine gena od interesa = $2^{-\Delta\Delta CT}$) kako bi se dobio omjer normalizirane količine gena od interesa u uzorku u odnosu na normaliziranu količinu gena od interesa u kalibratoru. Broj 2 je zapravo efikasnost umnažanja. Pošto ova metoda podrazumijeva da je umnažanje svih gena jednako ili slično može se uvrstiti vrijednost 2 kao efikasnost umnažanja, što bi značilo da se iz jedne molekule kalupa nakon jednog PCR ciklusa dobiju dvije molekule.

3.2.6 Odabir polimorfnih biljega iz baza podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (engl. *National Center for Biotechnology Information, NCBI*)

Odabir polimorfnih biljega koji su uključeni u analizu genotipizacije napravljen je pomoću baze podataka koja sadrži popis mutacija/polimorfizama unutar funkcionalno značajnih regija proteina/gena. Prilikom odabira biljega koje smo uključili u analizu koristili smo se slijedećim kriterijima: 1. epidemiološki ili molekularno-biološki literaturni nalazi koji bi upućivali na povezanost gena od interesa s poremećenom funkcijom/ekspresijom; 2. učestalost manje zastupljenog alela (engl. *Minor Allele Frequency, MAF*) u testiranim populacijama mora biti veća od 10%. U tu svrhu koristili smo se bazama podataka NCBI i PubMed (175) (1). U ovom istraživanju analizirana je učestalost dva odabrana polimorfna biljega unutar ACE2 gena koji su zadovoljili kriterije prethodno definirane kriterije: rs879922 i rs2285666. Ovi polimorfizmi odabrani su zbog njihove potencijalne uloge u regulaciji funkcije ACE2 proteina koji je potencijalno uključen u patofiziologiju KOPB-a. Analizirana je distribucija alela i genotipova među ispitanicima s dijagnosticiranim KOPB-om te kontrolnom skupinom zdravih ispitanika, uz praćenje njihove povezanosti s kliničkim karakteristikama bolesti. Rezultati ove analize omogućit će bolje razumijevanje potencijalne genetske predispozicije za KOPB te pružiti nove uvide u ulogu gena ACE2 u patofiziološkim mehanizmima bolesti.

3.2.7 ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

U svrhu određivanja indirektne funkcionalne značajnosti pronađenih genomskih promjena korištena je metoda ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). ELISA je imunoenzimski test visoke osjetljivosti za određivanje prisutnosti i koncentracije specifičnih analita (proteina) pomoću protutijela. Antigeni iz uzorka (analiti) vežu se na primarno antitijelo prethodno vezano za površinu polistirenske mikrotitarske ploče. Zatim se nanosi specifično detekcijsko antitijelo, koje tvori kompleks s analitom i sadrži kovalentno vezan enzim. Po inkubaciji ploče se ispiru otopinom deterdženta kako bi se uklonili proteini ili antitijela koja nisu specifično vezana. Nakon konačnog koraka ispiranja, ploča se razvija dodatkom enzimskog supstrata kako bi se proizveo vidljiv signal (promjena boje), što ukazuje na količinu antigena u uzorku. Analiza ELISA provedena je na serumima periferne krvi ispitanika uz korištenje komercijalno dostupnih reagensa u svrhu određivanja koncentracije proupalnih citokina (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α). Ovom metodom određena je koncentracija specifičnih citokina u serumu ispitivanih bolesnika s poznatim genotipom koji boluju od KOPB-. Utvrđena vrijednost uspoređena je sa genetičkom podlogom, kako bi na taj način dobili uvid u funkcionalnost analiziranih gena.

3.2.8 Statistička obrada podataka

Kategorijski podaci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su χ^2 testom. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Kontinuirani su podaci opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona, u slučaju preživljenja aritmetičkom sredinom s pripadnim 95% rasponom pouzdanosti. Razlike kontinuiranih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U testom (Hodges Lehmannova razlika s pripadnim 95 % intervalom pouzdanosti razlike). Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli za više od dvije nezavisne skupine testirane su Kruskal -Wallisovim testom (176).

Analiza genotipova učinjena je online programom SNPstats (176). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na Alpha = 0,05.

Preživljenje bolesnika s KOPB-om u odnosu na varijante gena ACE2 prikazane su Kaplan – Meierovim krivuljama, a razlike su testirane Log-rank testom. Za statističku analizu korišteni

su statistički paket MedCalc® Statistical Software version 20.100 (177) i SPSS Statistics 23 (178) a dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički.

Ocjena rada
u tisku

4 REZULTATI

4.1 Rezultati analize općih karakteristika ispitanika

Cilj analiza bio je ispitati opće karakteristike studijske populacije tj. bolesnika koji boluju od KOPB-a, usporedno sa kontrolnom skupinom zdravih ispitanika. Ispitivana je dob, spol, pušački status. U bolesnika koji boluju od KOPB-a uključeni su spirometrijski parametri: forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1), forsirani vitalni kapacitet (FVC), te Tiffeneau indeks (FEV1/FVC), kao pokazatelji stupnja opstrukcije dišnih putova. Težina KOPB-a je klasificirana prema GOLD kriterijima počevši od najblažeg do najtežeg stadija bolesti (1, 2, 3, 4). U bolesnika s KOPB-om određene su serumske koncentracije proupalnih citokina (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), neutrofila, fibrinogena i CRP-a radi daljnje potrebe asocijacijskih studija u svrhu istraživanja povezanosti odabranih polimorfnih biljega s rizikom za nastanak KOPB-a. Svi demografski i klinički parametri prikazani su u Tablicama 1-3, te Slici 5.

Istraživanje je provedeno na 576 ispitanika, od kojih je 263 (45,7 %) zdravih ispitanika (kontrolna skupina) i 313 (54,3 %) ispitanika s KOPB-om.

Rezultati pokazuju da su značajno stariji bolesnici s KOPB-om, u odnosu na kontrolnu skupinu (medijan 61 godina vs. 37 godina) (Mann Whitney U Test, $P < 0,001$) (Tablica 1).

Muškarci su značajno više zastupljeni u kontrolnoj skupini a žene u skupini s KOPB-om (χ^2 test, $P < 0,001$). Obzirom na pušački status najviše je bivših pušača, 196 (35,9 %) od kojih su značajno svi s KOPB-om, dok su nepušači značajnije više zastupljeni u kontrolnoj skupini (χ^2 test, $P < 0,001$) (Tablica 1).

Tablica 1. Opća obilježja ispitanika u odnosu na skupine

	Kontrolna Skupina	KOPB	Ukupno	Razlika ‡	95% CI (raspon pouzdanosti)	P*
Dob bolesnika (godine) [Medijan (IQR)]	37 (28 – 44)	61 (54 – 69)		25	23 do 27	<0,001 †
Pušački status (n = 546) [n (%)]						
Aktivni pušač	64 (24)	69 (24)	133 (24)			<0,001 *
Bivši pušač	0	196 (69)	196 (35,9)			
Nepušač	199 (76)	18 (6)	217 (40)			
Ukupno	263 (100)	283 (100)	546 (100)			
Spol (n = 574) [n (%)]						
Muškarci	231 (88)	209 (67)	440 (77)			<0,001 *
Žene	32 (12)	102 (33)	134 (23,3)			
Ukupno	263 (100)	311 (100)	574 (100)			

IQR – interkvartilni raspon; * χ^2 test; † Mann Whitney U test; ‡ Hodges-Lehmann razlika medijana

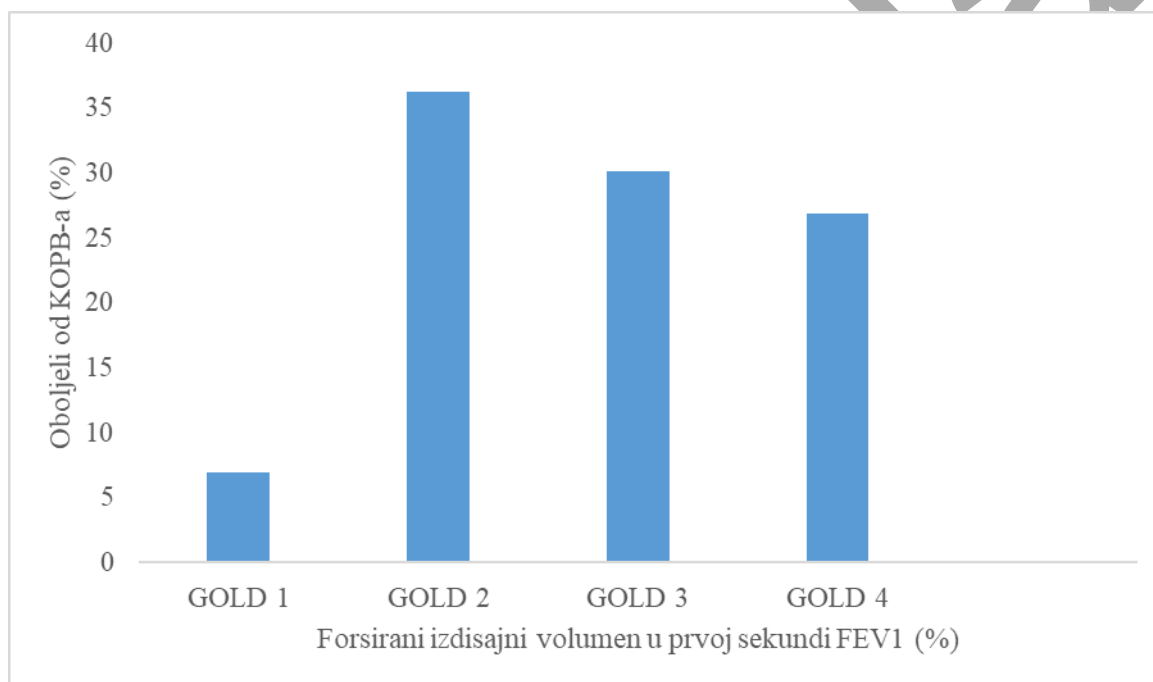
Nalazi plućnih funkcija kod oboljelih od KOPB-a prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Nalazi plućne funkcije u skupini bolesnika oboljelih od KOPB-a

	Broj Bolesnika	Medijan (interkvartilni raspon)	Raspon od najmanje do najviše vrijednosti
FVC	110	2,29 (1,74 - 2,77)	0,55 - 4,03
FEV ₁ (L)	110	1,11 (0,69 - 1,61)	0,3 - 4,2
FEV ₁ (%)	246	46,05 (29,33 - 63,05)	10,5 – 120

Na temelju rezultata spirometrije i stupnja bronhoopstrukcije (FEV₁), a prema smjernicama Globalne inicijative za KOPB, bolesnike smo svrstali u skupine prema težini bolesti: GOLD 1 (blagi), GOLD 2 (umjereni), GOLD 3 (teški) i GOLD 4 (vrlo teški).

Obzirom na vrijednosti FEV1 uočava se da je najviše bolesnika s KOPB-om, njih 89 (36,2 %) s umjerenim stadijem bolesti GOLD 2 (50 % – 79%), 74 (30,1 %) bolesnika s umjereno teškim stadijem bolesti GOLD 3, (30 % - 49 %), a 66 (26,8 %) s teškim stadijem bolesti GOLD 4 (0 – 29 %). Blagi oblik bolesti GOLD 1 s vrijednostima FEV1 $\geq 80\%$ (GOLD 1) detektiran je kod 17 (6,9 %) bolesnika (Slika 4).



Slika 5. Raspodjela bolesnika s KOPB-om u odnosu na forsirani izdisajni volumen u prvoj sekundi (FEV₁(%)), tj. prema težini bolesti

U skupini bolesnika koji boluju od KOPB-a određivali smo serumske razine proupalnih citokina, neutrofila, CRP-a i fibrinogena. Budući da kao proupalne komponente imaju svoje važno mjesto u patogenezi KOPB-a, vrijednosti ovih parametara koristile su se kasnije isključivo u svrhu asocijacijskih studija radi određivanja indirektna funkcionalne značajnosti ispitivanih polimorfizama. Prikazani su kroz raspon od najmanje do najviše vrijednosti (Tablica 3).

Rezultati pokazuju široki raspon izmjerenih vrijednosti za sve ispitivane parametre unutar ispitivane populacije ispitanika s KOPB-om, kako za proupalne citokine, tako i za neutrofile, CRP i fibrinogen.

Tablica 3. Serumske koncentracije proupalnih citokina (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α), neutrofili, CRP i fibrinogen u skupini bolesnika s KOPB-om

	Broj Bolesnika	Medijan (interkvartilni raspon)	Raspon od najmanje do najviše vrijednosti
Interleukin - 1 α	109	0,43 (0,31 - 2,13)	0,305 - 591,27
Interleukin - 1 β	109	6,9 (0,59 - 24,32)	0,1 - 175,2
Interleukin – 6	109	32,17 (10,56 - 64,39)	0,53 - 291,47
Interleukin – 8	109	8,73 (3,56 - 17,95)	0,12 - 175,16
TNF α	109	8,24 (0,35 - 19,3)	0,35 - 92,32
Neutrofili	248	5,4 (3,9 – 7,6)	1,72 – 84,0
Neutrofili (%)	248	65,45 (59 – 77)	39 - 98
CRP	248	5,24 (2,05 – 20,7)	0,17 – 435
Fibrinogen	245	4 (3,5 – 4,8)	0,7 – 101

4.2 Rezultati analize odabira polimorfnih biljega

Pretraživanjem baze podataka i dostupne literature odabrali smo dva polimorfna biljega gena *ACE2* koji su smješteni na X kromosomu, rs879922 i rs2285666. Oba polimorfizma smještena su u nekodirajućoj regiji gena *ACE2*. Polimorfizam rs879922 smješten je u intronu 11 gena *ACE2*. Karakterizira ga promjene dušične baze C (citozin) u bazu G (guanin) unutar nukleotida. Polimorfizam rs2285666 poznat i kao G8790A smješten je u 3 intronu gena *ACE2*, a karakterističan je zbog promjene dušične baze C (citozin) u A (adenin), G (guanin) i T (timin) (Tablica 4) (175). Obzirom da su oba polimorfizma smještena u nekodirajućoj regiji gena ne utječu na promjenu u slijedu aminokiselina, a obzirom na epigenetske faktore mogu utjecati na razinu ekspresije gena/proteina ili na funkcionalnost proteina.

Tablica 4. Prikaz odabranih polimorfnih biljega s obzirom na njihovu poziciju u genomu, učestalost manje zastupljenog alela (MAF, od engl. *minor allele frequency*) i opis promjene na razini nukleotida.

Naziv	Pozicija	Aleli	MAF
rs879922	Intron 11	C>G	0.58
rs2285666 (G8790A)	Intron 3	C>A / C>G / C>T	0.20 (za alel T)

C - citozin, G - guanin, A – adenin, T – timin, MAF – učestalost manje zastupljenog alela od engl. *minor allele frequency*

4.3 Rezultati analize povezanosti odabranih polimorfnih biljega gena *ACE2* u skupini ispitanika s KOPB-om i zdravih ispitanika

Cilj ovih analiza bio je ispitati povezanost odabranih SNP-ova s nastankom KOPB-a. Ispitivana je učestalost raspodjele polimorfnih biljega između dvije skupine ispitanika: ispitanici s dijagnosticiranim KOPB-om (slučajevi; od engl. *cases*) i zdrava skupina ispitanika (kontrole). Cilj je bio istražiti povezanost raspodjele genotipova u navedenim skupinama ispitanika te tako ispitati postoji li povezanost specifičnog genotipa sa sklonošću za razvoj KOPB-a. Uspoređivana je distribucija frekvencije alela odabranih polimorfizama među definiranim skupinama. Modelom logističke regresije utvrđena je povezanost između izdvojenih polimorfizama i kategoriziranih skupina. Ishod ili zavisnu varijablu predstavlja pripadnost skupini dok nezavisnu ili eksplanatornu varijablu predstavljaju kombinacije alela (AA, AB, BB). Mjeru učinka tog SNP-a na rizik za razvoj KOPB-a izražena je pomoću omjera izgleda (engl. OR, *Odds Ratio*).

Uspoređujući rezultate kontrolne skupine i skupine bolesnika s KOPB-om, utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti u razdiobi alelnih kombinacija unutar polimorfizma rs2285666, odnosno značajno je učestalija heterozigotna alelna kombinacija CT u bolesnika s KOPB-om (OR = 5,4, CI 95 % 2,3 – 12,3, $P = <0,001$). Također, utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti i razdiobi genotipova SNP-a rs2285666, kako u dominantnom (za CT-TT: OR = 1,6, CI 95 % 1,03 – 2,39, $P = 0,03$) tako i u super dominantnom (za CT: OR = 5,5, CI 95 % 2,4 – 12,5, $P < 0,001$) genetičkom modelu, doprinoseći riziku za KOPB od 1,06 – 5,5 puta ovisno o genetičkom modelu nasljeđivanja. U razdiobi alela polimorfizma rs879922, utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti i razdiobi genotipa samo u superdominantnom (za GC: OR = 1,9, CI 95 % 1,08 – 3,21, $P = 0,02$) genetičkom modelu (Tablica 5).

Rezultati istraživanja sugeriraju da su oba istraživana polimorfizma rs2285666 i rs879922 *ACE2* gena statistički značajno povezana sa nastankom KOPB-a.

Tablica 5. Raspodjela i učestalost genetičkih modela nasljeđivanja dva SNP-a *ACE2* gena između skupine bolesnika s KOPB-om i kontrolne skupine

		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % interval pouzdanosti)	P*
		Kontrolna skupina (n = 261)	KOPB (n = 290)		
<i>rs2285666</i>	Kodominantno				
	CC	193 (81)	195 (73)	1	<0,001
	CT	7 (3)	38 (14)	5,4 (2,3 – 12,3)	
	TT	39 (16)	35 (13)	0,89 (0,54 – 1,46)	
	Allele C	393 (82)	428 (80)	0,9 (0,62 – 1,18)	0,34
	T	85 (18)	108 (20)		
	Dominantno				
	CC	193 (81)	195 (73)	1	0,03
	CT-TT	46 (19)	73 (27)	1,6 (1,03 – 2,39)	
	Recesivno				
<i>rs879922</i>	CC-CT	200 (84)	233 (87)	1	0,30
	TT	39 (16)	35 (13)	0,8 (0,47 – 1,26)	
	Superdominantno				
	CC-TT	232 (97)	230 (86)	1	<0,001
	CT	7 (3)	38 (14)	5,5 (2,40 – 12,5)	
	Kodominantno				
	GG	145 (56)	94 (33)	1	0,07
	GC	22 (8)	42 (15)	1,9 (1,05 – 3,24)	
	CC	145 (56)	150 (52)	0,98 (0,82 – 1,6)	
	Allele G	312 (60)	342 (60)	1,0 (0,78 – 1,26)	0,94
	C	208 (40)	230 (40)		
	Dominantno				
	GG	145 (56)	150 (53)	1	0,44
	GC-CC	115 (44)	136 (48)	1,1 (0,82 – 1,6)	
	Recesivno				
	GG-GC	167 (64)	192 (67)	1	0,48
	CC	93 (36)	94 (33)	0,9 (0,62 – 1,25)	
	Superdominantno				
	GG-CC	238 (92)	244 (85)	1	0,02
	GC	22 (8)	42 (15)	1,9 (1,08 – 3,21)	

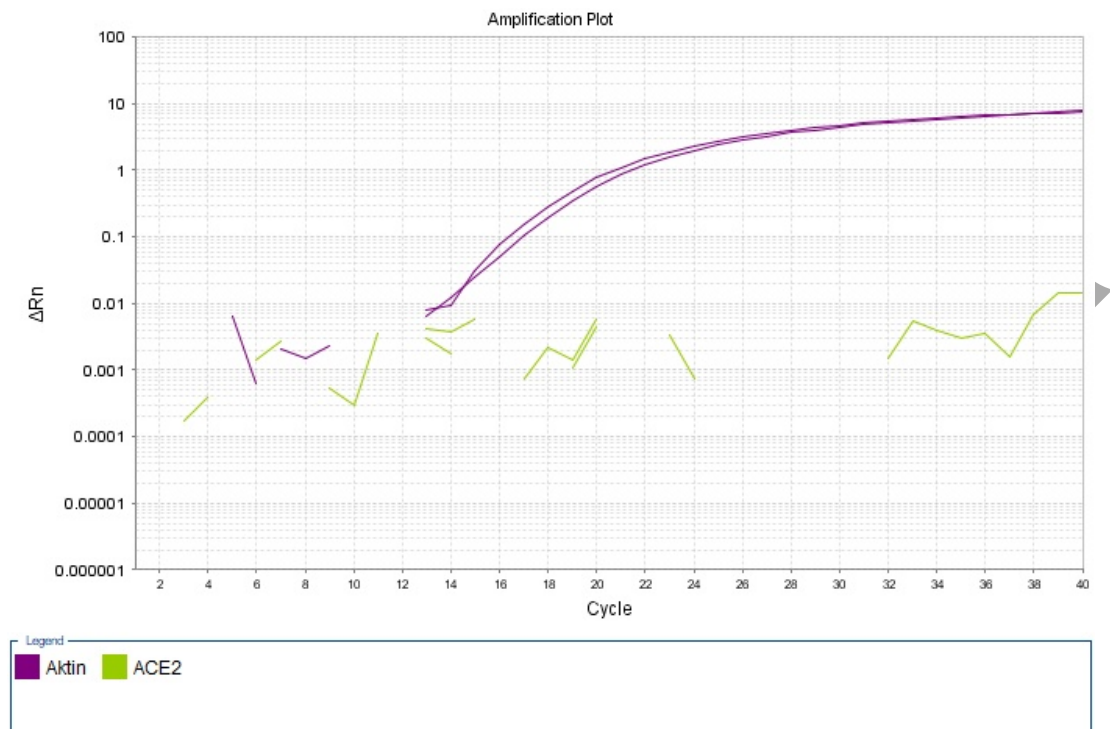
a - Hardy-Weinberg equilibrium: kontrolna skupina < 0,05; bolesnici s KOPB P < 0,05 za oba SNP-a

* χ^2 test

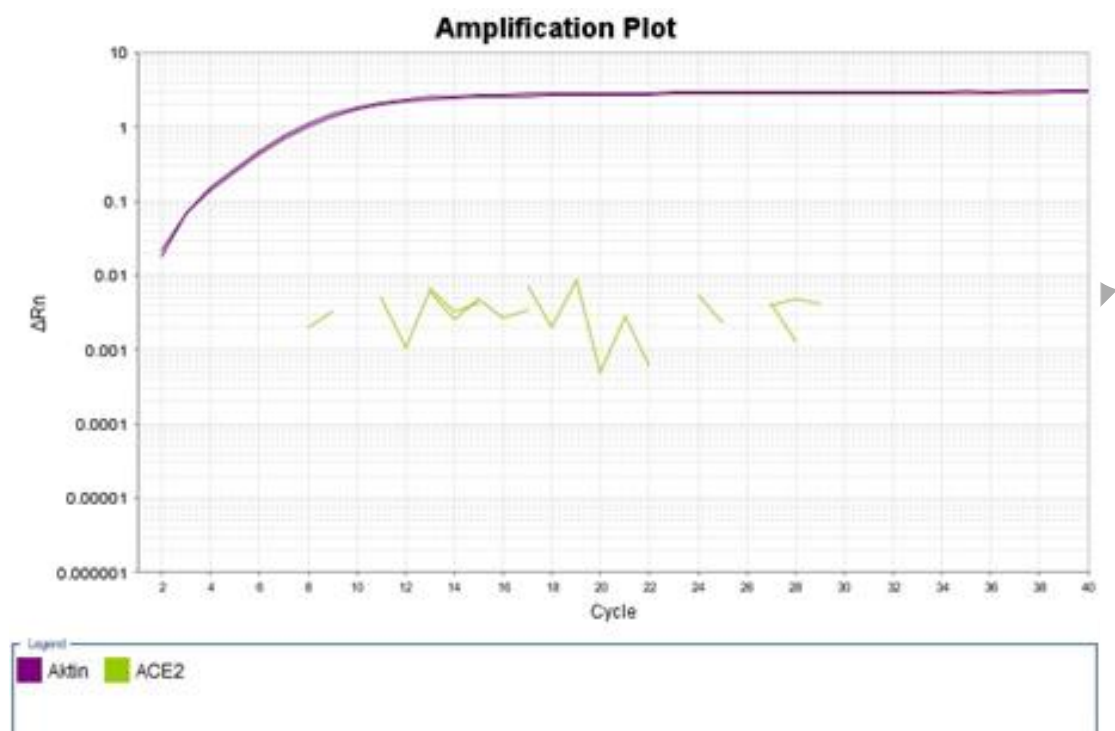
4.4 Rezultati analize relativne ekspresije gena *ACE2* poznatim genotipom

Cilj ove analize bio je odrediti razinu ekspresije gena *ACE2* u stanicama perifernih nukleara osoba s poznatim genotipom. Točnije, zanimalo nas je ima li prisutnost specifičnog genotipa utjecaj na razinu ekspresije gena *ACE2*. Obzirom da ne postoje literaturni podaci o razini ekspresije gena *ACE2* u stanicama perifernih mononukleara, prilikom postavljanja ciljeva ovog doktorskog rada pretpostavili smo da bi visoko osjetljivom metodom kao što je RT-PCR trebali biti u stanju detektirati i minimalnu razinu ekspresije. Međutim, rezultati naših analiza pokazuju da ekspresiju gena *ACE2* nije bilo moguće detektirati lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR, engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Sve to ukazuje na činjenicu da primjenom odabrane metode nije bilo moguće ispitati postavljeni cilj.

Prema rezultatima analize testnih uzoraka, prikazanim na (Slici 6a, 6b), jasno se vidi da je uspješnost amplifikacije endogene kontrole (aktin – krivulja ljubičaste boje) zadovoljavajuća, za razliku od amplifikacijske krivulje gena od interesa (*ACE2* – krivulja zelene boje), što ukazuje na činjenicu da je kvaliteta korištenog materijala dobra. U uzorku niti nakon predamplifikacije (Slika 6b) nije bilo moguće detektirati razinu ekspresije mRNA.



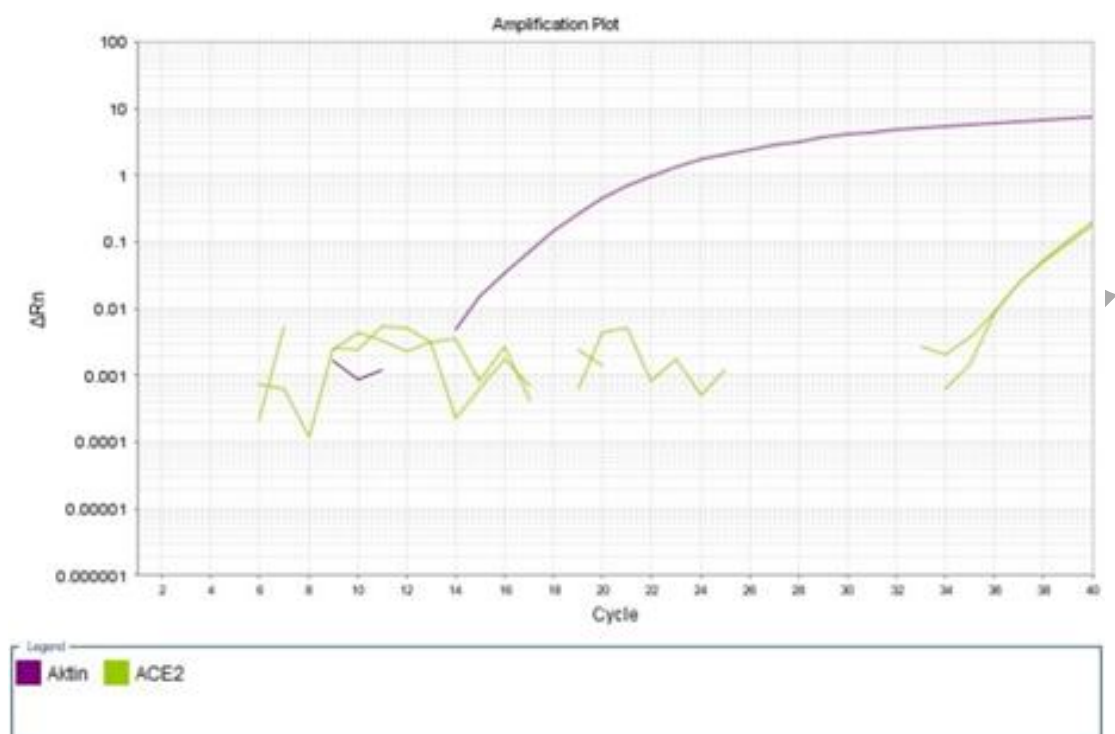
Slika 6a. Prikazan je pomak u Ct (*engl. cycle treshold*) vrijednosti aktina (ljubičasta krivulja) u uzorku (46C) prije predamplifikacije, bez pomaka Ct vrijednosti mRNA ACE2 (zelena krivulja).



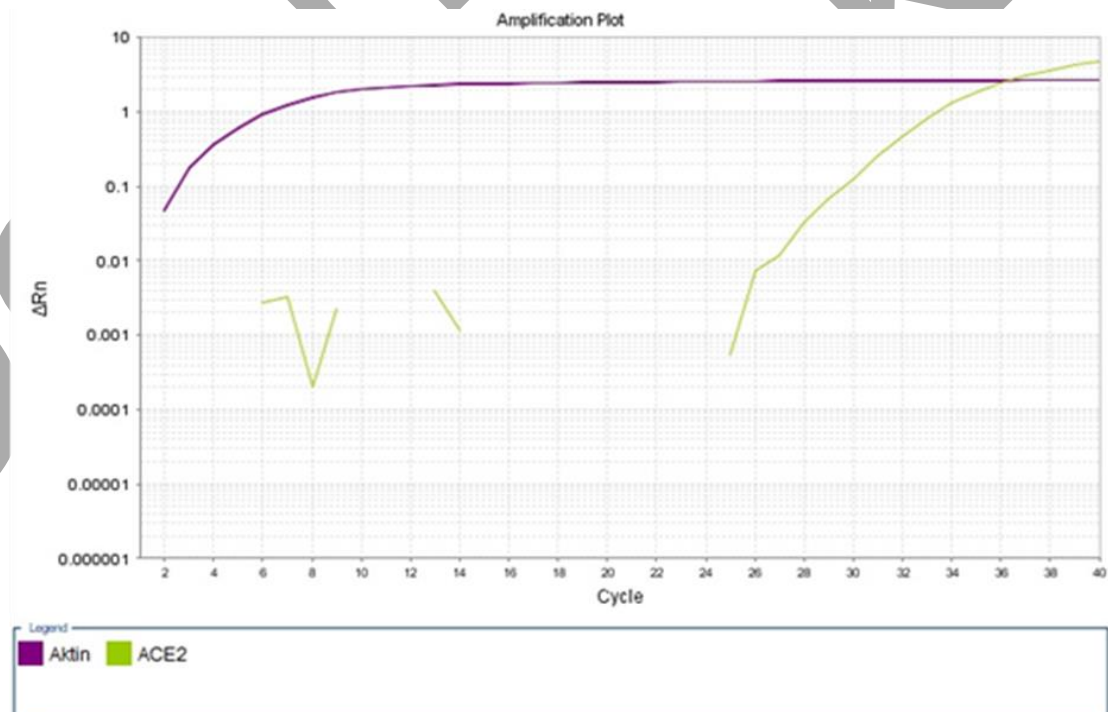
Slika 6b. Prikazan je pomak u Ct vrijednosti aktina ((ljubičasta krivulja) u uzorku (46C) nakon predamplifikacije, bez pomaka Ct vrijednosti mRNA ACE2 (zeleni krivulja).

Budući da u dva testna uzorka nismo uspjeli detektirati ekspresiju gena *ACE2* u nastavku istraživanja kako bi ispitali ekspresiju gena *ACE2* i na ostalim uzorcima poznatog genotipa, uključili smo i ostale ispitanike. Predamplifikaciji, te zatim qPCR analizi podvrgnuto je ukupno 47 uzoraka, te je u samo 2 uzoraka (15C i 113C) detektirana ekspresija gena *ACE2*, što potvrđuje ispravnost probe.

Rezultati ovih analiza prikazuju da je bilo moguće detektirati ekspresiju gena *ACE2* samo kod 2 ispitanika, i to samo pod uvjetima predamplifikacije (Slika 7a, 7b).



Slika 7a. Uz pomak u Ct vrijednosti aktina (ljubičasta krivulja) u uzorku (15C) nakon predamplifikacije, vidi se jasan pomak i u Ct vrijednosti mRNA ACE2 (zelena krivulja).



Slika 7b. Uz pomak u Ct vrijednosti aktina (ljubičasta krivulja) u uzorku (113C) nakon predamplifikacije, vidi se jasan pomak i u Ct vrijednosti mRNA ACE2 (zelena krivulja).

Zaključno možemo reći da obzirom na krivu pretpostavku o mogućnosti detekcije ekspresije gena *ACE2* u stanicama perifernih mononukleara, nismo bili u mogućnosti ispitati postoji li potencijalna povezanost prisutnosti određenih polimorfnih biljega unutar gena *ACE2* s promjenom ekspresije toga gena.

4.5 Rezultati funkcionalne analize testiranih SNP-ova

Cilj ovih analiza bio je ispitati indirektnu funkcionalnu povezanost ispitivanih polimorfizama rs2285666 i rs879922 unutar gena *ACE2* u bolesnika s KOPB-om kroz mjeru serumske koncentracije odabranih proupalnih citokina, općih upalnih biljega i parametara plućne funkcije.

4.5.1 Rezultati analize povezanosti serumske koncentracije proupalnih citokina IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) s polimorfizmima rs2285666 i rs879922 unutar gena *ACE2* u bolesnika s KOPB-om

Obzirom da su rezultati analize povezanosti genotipova i rizika za razvoj bolesti istaknule da su oba polimorfizma gena *ACE2* rs2285666 i rs879922 statistički značajno povezana sa razvojem KOPB-a, cilj ove analize bio je ispitati indirektnu funkcionalnu značajnost navedenih polimorfizama. Ovim testiranjem željeli smo ispitati da li prisutnost navedenih polimorfizama utječe na koncentraciju testiranih proupalnih citokina (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) u serumu bolesnika, imajući na umu da kao proupalne komponente imaju ulogu u patogenezi KOPB-a. Korišten je ELISA test (eBioscience, San Diego, SAD). Rezultati su prikazani kao odnos koncentracija navedenih ispitivanih citokina i alelnih varijanti polimorfizma. Prikazana je distribucija heterozigotnih i homozigotnih nosioca oba varijantna alela.

4.5.1.1 Rezultati analize povezanosti serumske koncentracije proupalnih citokina IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) s polimorfizmom rs2285666 unutar gena *ACE2* u bolesnika s KOPB-om

Istraženo je da li prisutnost SNP-a rs2285666 gena *ACE2* za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu ispitanika. Rezultati su prikazani u obliku tablice i slika.

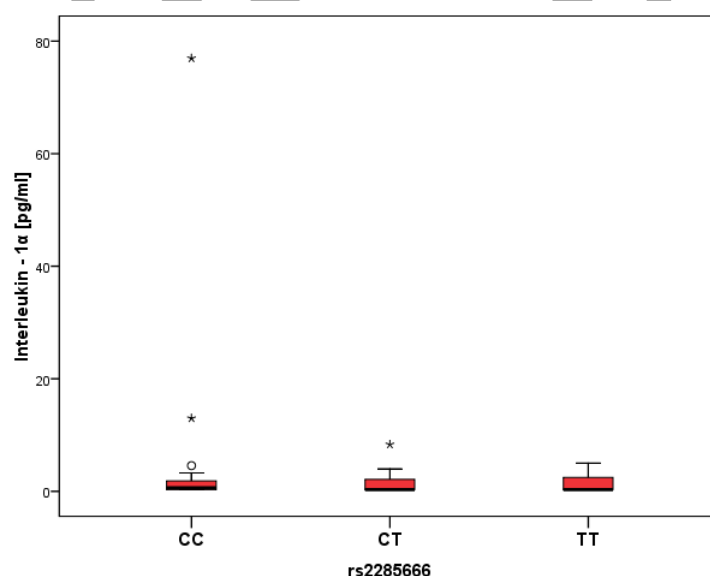
Rezultati pokazuju da prisutnost polimorfizma rs2285666 ne utječe na koncentraciju niti jednog od testiranih citokina u serumu ispitanika (Tablica 6).

Tablica 6. Vrijednosti serumske koncentracije proupalnih citokina ovisno o genotipu

rs2285666	N	Medijan (interkvartilni raspon)				P*
		CC	n	CT	TT	
IL - 1 α [pg/ml]	66	0,66 (0,31 - 1,89)	18	0,31 (0,31 - 2,26)	0,31 (0,31 - 2,56)	0,69
IL - 1 β [pg/ml]	66	6,59 (0,56 - 26,25)	18	8,13 (2,5 - 21,98)	3,87 (0,42 - 12,89)	0,59
IL - 6 [pg/ml]	66	36,09 (10,21 - 75,89)	18	28,39 (7,08 - 64,29)	20,58 (9,71 - 36,39)	0,55
IL - 8 [pg/ml]	66	9,7 (3,71 - 19,33)	18	6,6 (2,19 - 19,46)	6,4 (3,2 - 9,48)	0,16
TNF α [pg/ml]	66	8,21 (0,35 - 20,5)	18	4,73 (0,47 - 17,72)	6,62 (0,35 - 15,08)	0,72

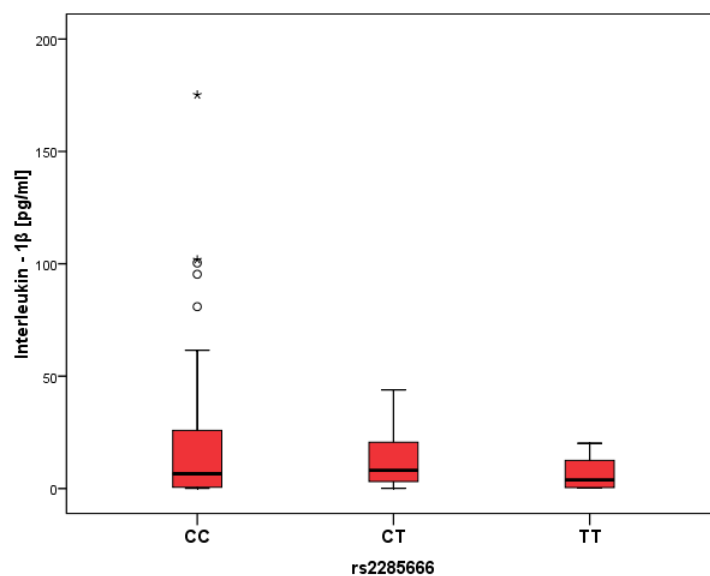
*Kruskal Wallis test (post hoc Conover)

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 1 α (P=0,69) za polimorfizam rs2285666 gena ACE2 (Slika 8).



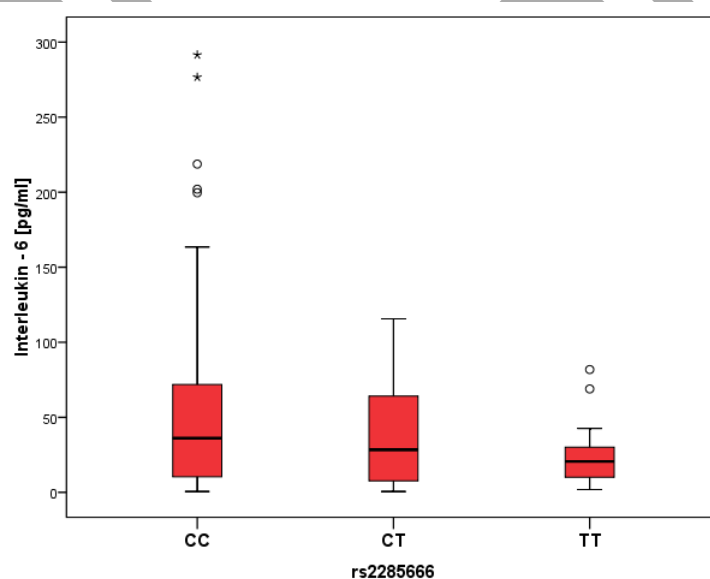
Slika 8. SNP rs2285666 gena ACE2 i koncentracija IL - 1 α (P=0,69) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL-1 β (P=0,59) za polimorfizam rs2285666 gena ACE2 (Slika 9).



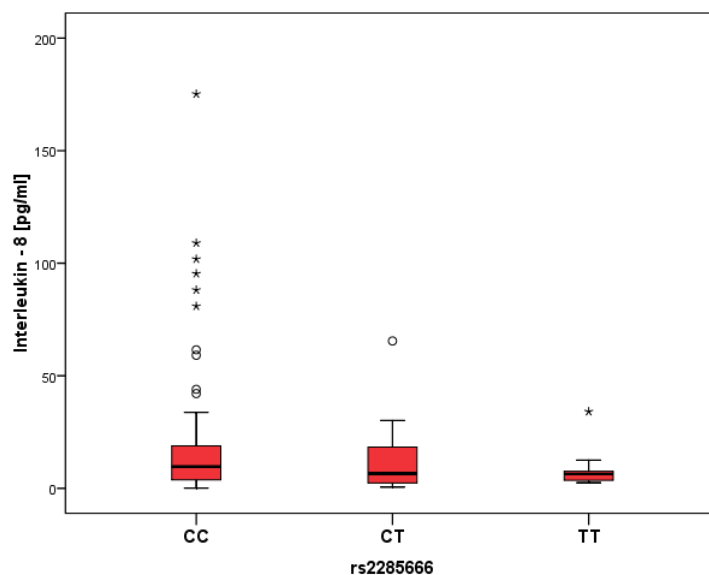
Slika 9. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija IL - 1 β ($P=0,59$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 6 ($P=0,55$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 10).



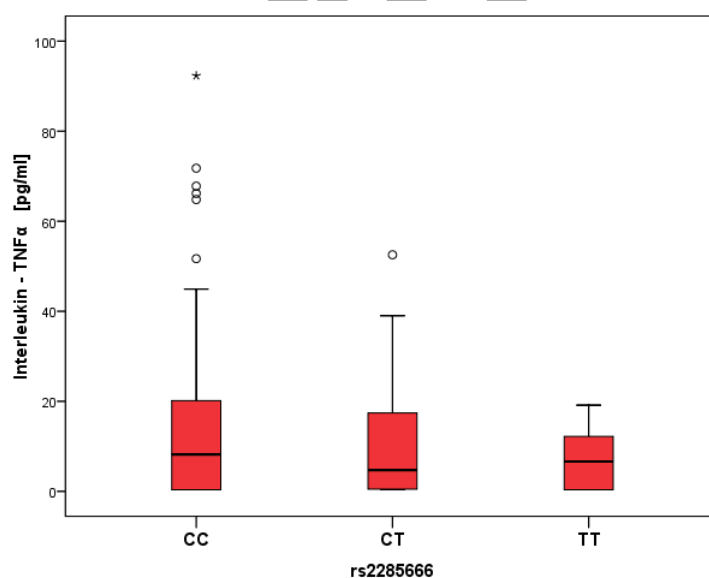
Slika 10. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija IL - 6 ($P=0,55$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 8 ($P=0,16$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 11).



Slika 11. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija IL – 8 ($P = 0,16$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - $TNF\alpha$ ($P=0,72$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 12).



Slika 12. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija $TNF\alpha$ ($P = 0,72$) u serumu.

4.5.1.2 SNP rs2285666 u dominantnom genetičkom modelu gena *ACE2* i

koncentracija IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu

Istraženo je da li u dominantnom genetičkom modelu prisutnost SNP-a rs2285666 gena *ACE2* za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu ispitanika. Rezultati su prikazani u obliku tablice i slika.

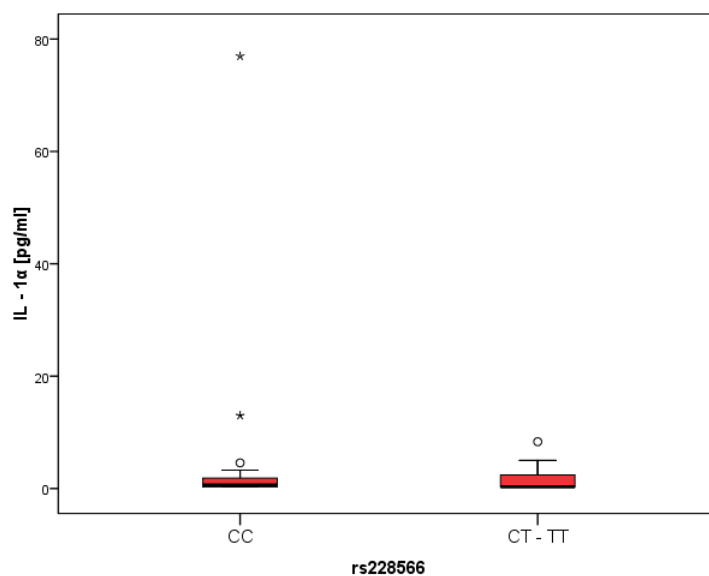
Rezultati pokazuju da niti u dominantnom genetičkom modelu prisutnost polimorfizma rs2285666 ne utječe na koncentracije testiranih proupalnih citokina u serumu bolesnika s KOPB-om (Tablica 7).

Tablica 7. Vrijednosti serumske koncentracije proupalnih citokina ovisno o genotipu u dominantnom genetičkom modelu SNP-ova gena *ACE2*

<i>rs2285666</i>	Medijan (interkvartilni raspon)				Razlika	95% raspon pouzdanosti	<i>P</i> *
	N	CC	N	CT – TT			
IL - 1 α [pg/ml]	66	0,66 (0,31 – 1,86)	31	0,31 (0,31 – 2,45)	0	-0,09 – 0	0,52
IL - 1 β [pg/ml]	66	6,593 (0,56 – 25,86)	31	5,06 (0,56 – 17,05)	-0,28	-5,95 – 2,63	0,58
IL - 6 [pg/ml]	66	36,09 (10,40 – 71,90)	31	22,66 (9,53 – 59,60)	-6,01	-22,7 – 6,32	0,38
IL - 8 [pg/ml]	66	9,69 (3,77 – 18,9)	31	6,40 (2,91 – 12,22)	-2,95	-6,85 – 0,12	0,06
TNF α [pg/ml]	66	8,21 (0,35 – 20,16)	31	5,46 (0,39 – 17,01)	-0,42	-5,70 – 1,02	0,48

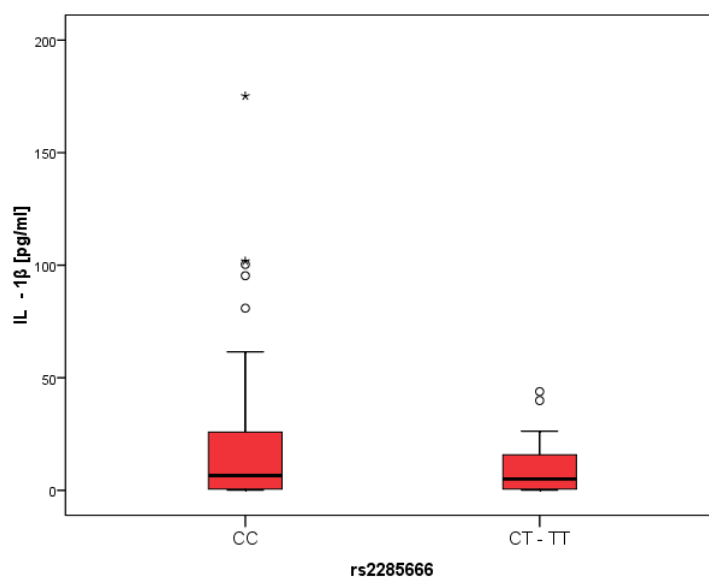
*Mann Whitney U test

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 1 α (*P* = 0,52) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 13).



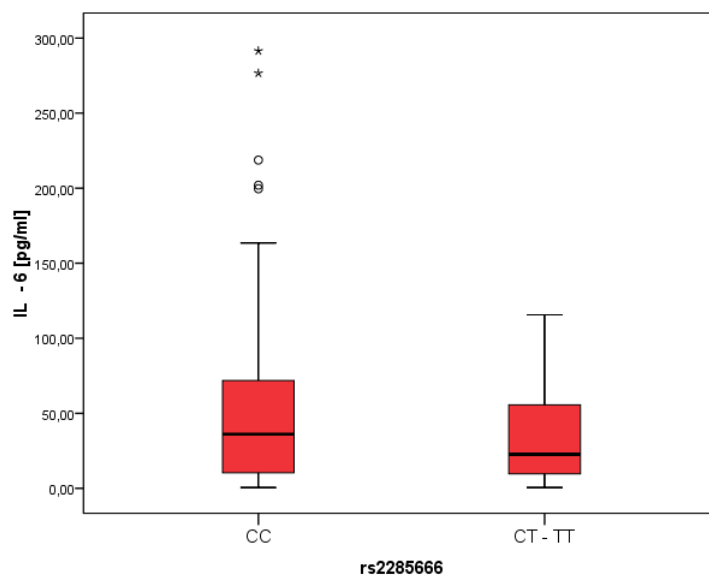
Slika 13. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija IL - 1 α (P = 0,52) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 1 β (P = 0,58) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 14).



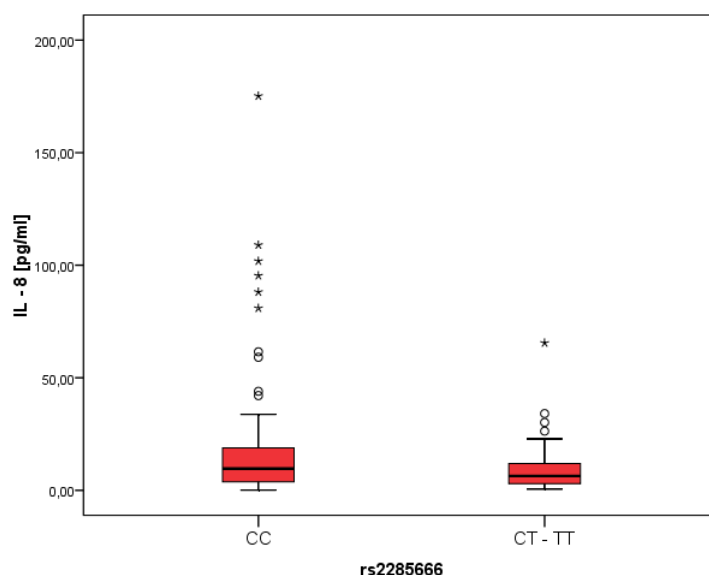
Slika 14. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija IL - 1 β (P = 0,58) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL – 6 ($P = 0,38$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 15).



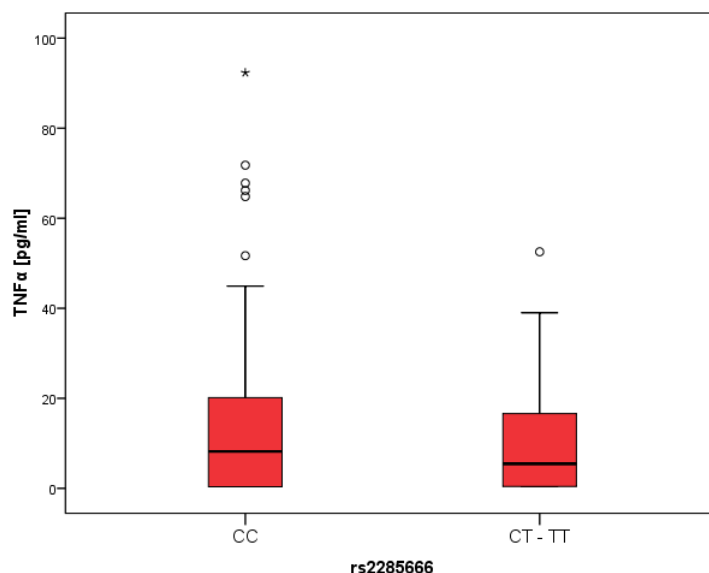
Slika 15. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija IL – 6 ($P = 0,38$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL – 8 ($P = 0,06$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 16).



Slika 16. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija IL – 8 ($P = 0,06$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina $\text{TNF}\alpha$ ($P = 0,48$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 17).



Slika 17. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija $\text{TNF}\alpha$ ($P = 0,48$) u serumu

4.5.1.3 SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$ u serumu

Istraženo je da li prisutnost SNP-a rs879922 gena *ACE2* za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, $\text{TNF}\alpha$ u serumu ispitanika.

U polimorfizmu rs879922, nositelji alelna kombinacije GG u odnosu na CC i CG imaju značajno niže serumske vrijednosti IL - 1 β (Kruskal Wallis test, $P = 0,004$), IL - 6 (Kruskal Wallis test, $P = 0,002$), IL - 8 (Kruskal Wallis test, $P = 0,02$) te $\text{TNF}\alpha$ (Kruskal Wallis test, $P = 0,006$) (Tablica 8, Slike 18, 19, 20, 21, 22).

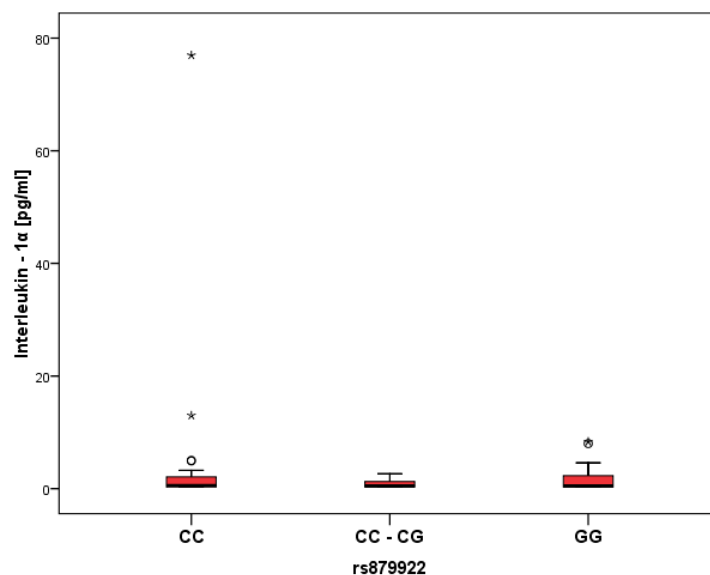
Tablica 8. Vrijednosti serumske koncentracije proupalnih citokina ovisno o genotipu

Medijan (interkvartilni raspon)							<i>P</i> *
<i>rs879922</i>	N	CC	N	CG	N	GG	
IL - 1 α [pg/ml]	36	0,61 (0,31 - 2,11)	16	0,48 (0,31 - 1,44)	48	0,48 (0,31 - 2,31)	0,73
IL - 1 β [pg/ml]	36	12,51 (2,7 - 44,5)	16	17,88 (1,36 - 40,6)	48	3,18 (0,41 - 11,24)	0,004 [†]
IL – 6 [pg/ml]	36	43,2 (15,53 - 117,57)	16	64,07 (13,44 - 103,88)	48	15,21 (8,89 - 37,31)	0,002 [†]
IL – 8 [pg/ml]	36	11,77 (4,12 - 41,52)	16	13,98 (4,09 - 25,12)	48	6,62 (3,26 - 10,88)	0,02 [†]
TNF α [pg/ml]	36	12,58 (2,99 - 23,32)	16	13,46 (1,31 - 42,2)	48	2,08 (0,35 - 10,89)	0,006 [†]

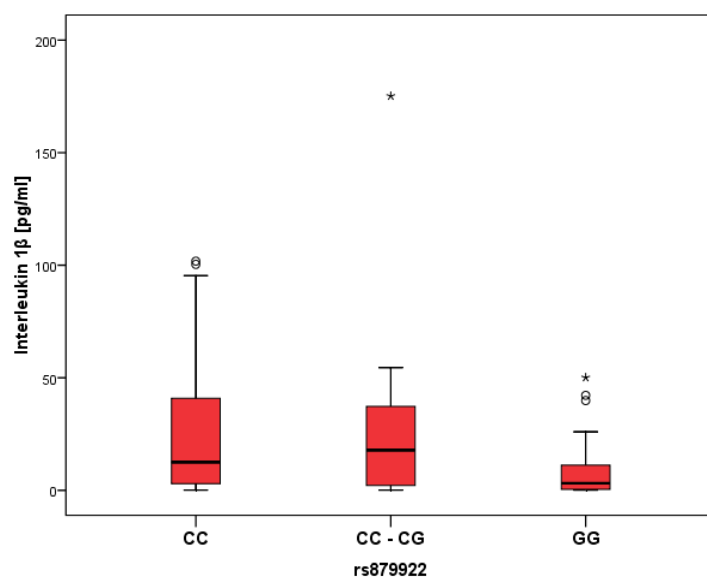
*Kruskal Wallis test (post hoc Conover)

[†]na razini P<0,05 značajno se razlikuje GG vs. (CC i CG)

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 1 α (P=0,73) za polimorfizam rs879922 gena ACE2 (Slika 18).

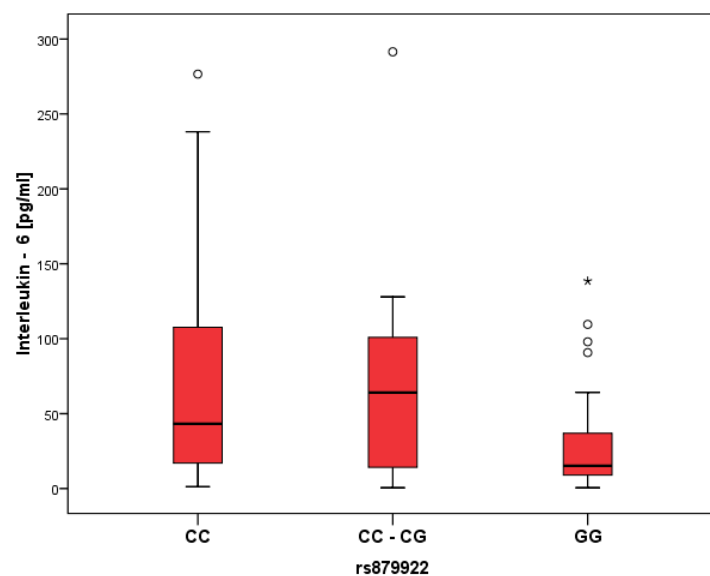
**Slika 18.** SNP rs879922 gena ACE2 i koncentracija IL - 1 α (P=0,73) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 1 β ($P = 0,004$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2*. Rezultati prikazuju da nositelji alelne kombinacije GG u odnosu na CC i CG imaju značajno niže serumske vrijednosti IL - 1 β (Slika 19).



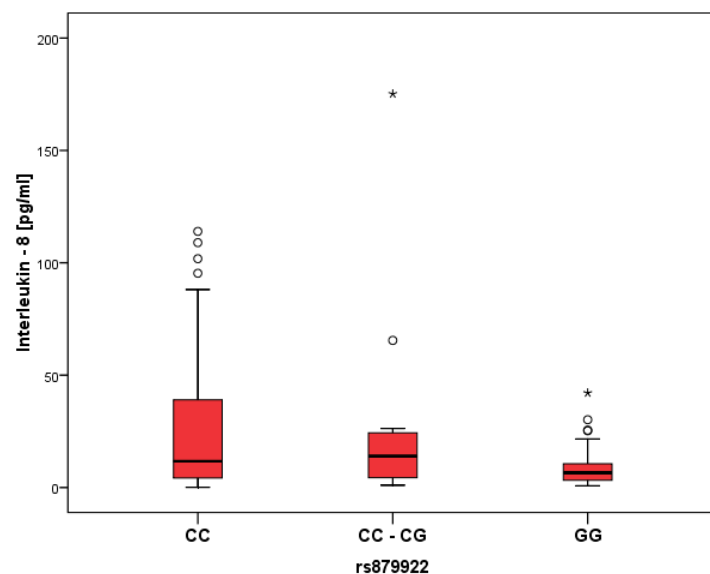
Slika 19. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija IL - 1 β ($P = 0,004$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 6 ($P = 0,002$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2*. Rezultati prikazuju da nositelji alelne kombinacije GG u odnosu na CC i CG imaju značajno niže serumske vrijednosti IL - 6 (Slika 20).



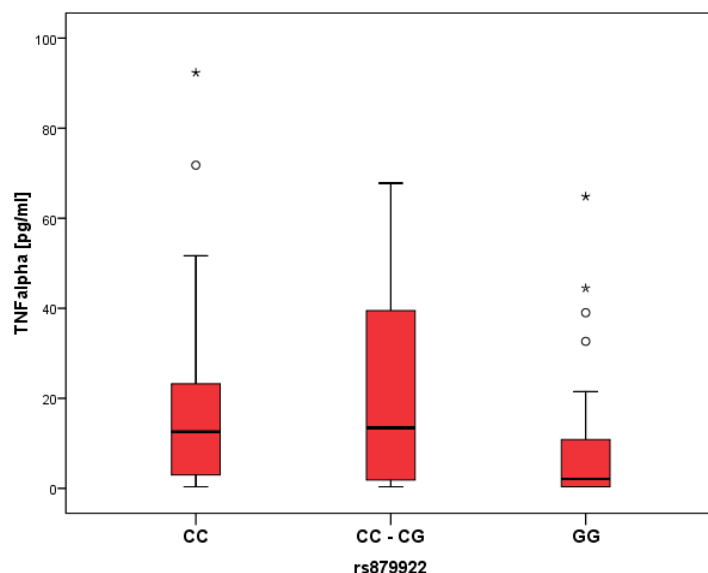
Slika 20. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija IL - 6 ($P = 0,002$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 8 ($P = 0,002$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2*. Rezultati prikazuju da nositelji alelne kombinacije GG u odnosu na CC i CG imaju značajno niže serumske vrijednosti IL - 8 (Slika 21).



Slika 21. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija IL - 8 ($P = 0,02$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina TNF α ($P = 0,006$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2*. Rezultati prikazuju da nositelji alelna kombinacije GG u odnosu na CC i CG imaju značajno niže serumske vrijednosti TNF α (Slika 22).



Slika 22. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija TNF α ($P = 0,006$) u serumu.

4.5.1.4 SNP rs879922 u dominantnom genetičkom modelu gena *ACE2* i koncentracija IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu

Istraženo je da li u dominantnom genetičkom modelu prisutnost SNP-a rs879922 gena *ACE2* za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α u serumu ispitanika. Rezultati su prikazani u obliku tablice i slika.

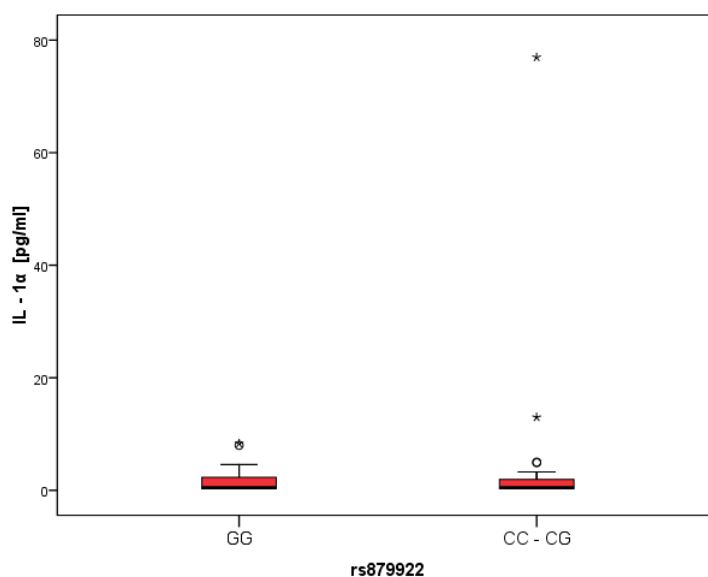
Rezultati istraživanja pokazuju da je u dominantnom genetičkom modelu prisutnost polimorfizma rs879922 u bolesnika s KOPB-om značajno povezana sa višim vrijednostima svih proupalnih citokina za alelna kombinacije CC-CG osim za za IL-1 α , gdje se ne uočava značajna razlika između homozigotne i heterozigotne alelna kombinacije (Tablica 9).

Tablica 9. Vrijednosti serumske koncentracije proupalnih citokina ovisno o genotipu u dominantnom genetičkom modelu SNP-ova gena *ACE2*

		Medijan (interkvartilni raspon)			Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
rs879922	N	GG	n	CC – GC			
IL - 1 α [pg/ml]	48	0,48 (0,31 – 2,31)	52	0,48 (0,31 – 1,95)	0	-0,09 – 0,02	0,86
IL - 1 β [pg/ml]	48	3,19 (0,42 – 11,23)	52	12,51 (2,97 – 38,81)	7,75	2,12 – 16,76	<0,001
IL – 6 [pg/ml]	48	15,21 (8,98 – 36,92)	52	46,72 (14,97 – 100,89)	25,63	9,44 – 43,9	<0,001
IL – 8 [pg/ml]	48	6,62 (3,26 – 10,63)	52	11,80 (4,25 – 32,26)	5,71	1,31 – 10,91	0,005
TNF α [pg/ml]	48	2,08 (0,35 – 10,85)	52	12,58 (2,96 – 25,56)	5,36	1,20 – 12,05	0,001

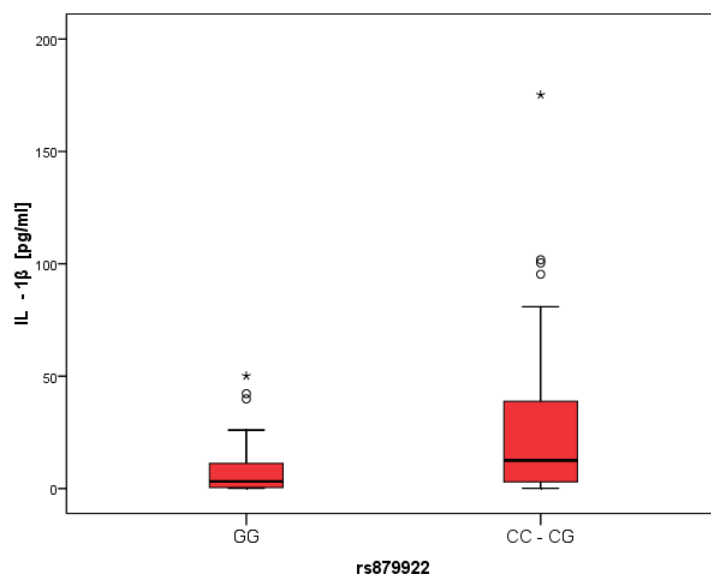
*Mann Whitney U test

Rezultati istraživanja pokazuju da u dominantnom genetičkom modelu prisutnost polimorfizma rs879922 u bolesnika KOPB-om ne utječe na vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 1 α (P = 0,86) između ispitivane homozigotne i heterozigotne alelne kombinacije (Slika 23).



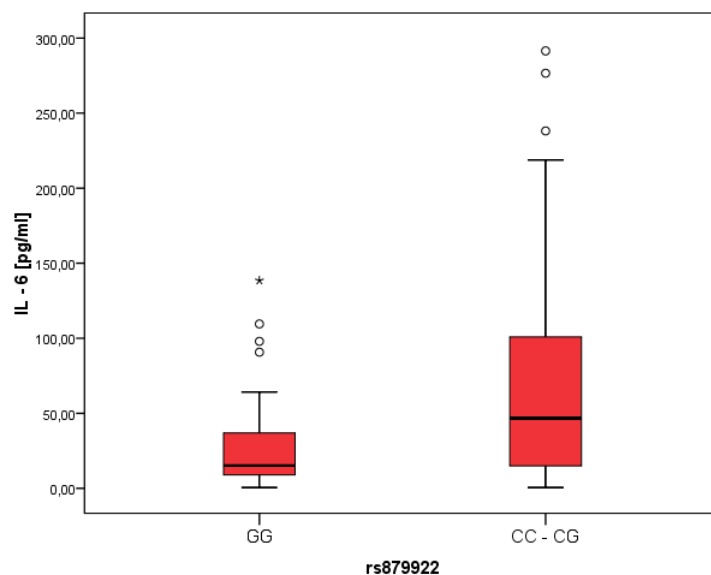
Slika 23. SNP rs879922 gena ACE2 i koncentracija IL - 1 α (P = 0,86) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 1 β (P <0,001) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs879922 gena ACE2. Nositelji alelne kombinacije CC-CG u odnosu na GG imaju značajno više serumske vrijednosti IL - 1 β (Slika 24).



Slika 24. SNP rs879922 gena ACE2 i koncentracija IL - 1β (P <0,001) u serumu

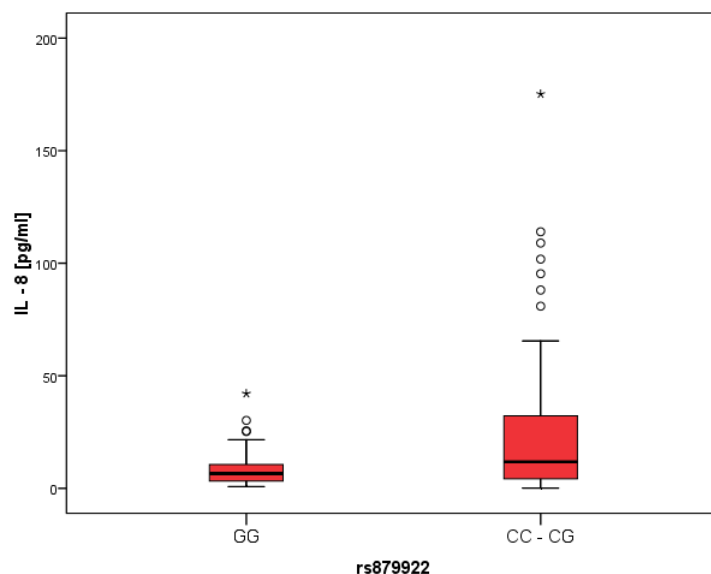
Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 6 (P <0,001) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs879922 gena ACE2. Nositelji alelna kombinacije CC-CG u odnosu na GG imaju značajno više serumske vrijednosti IL - 6 (Slika 25).



Slika 25. SNP rs879922 gena ACE2 i koncentracija IL - 6 (P <0,001) u serumu

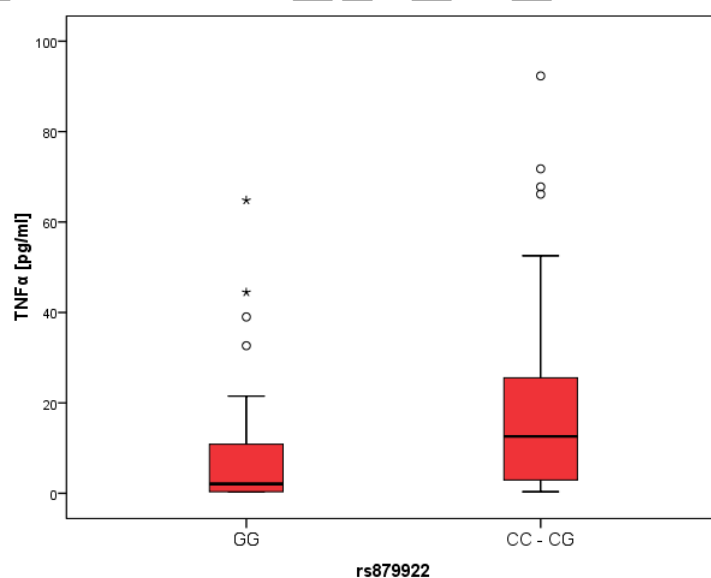
Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina IL - 8 (P = 0,005) u dominantnom genetičkom modelu

polimorfizma rs879922 gena *ACE2*. Nositelji alelne kombinacije CC-CG u odnosu na GG imaju značajno više serumske vrijednosti IL - 8 (Slika 26).



Slika 26. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija IL - 8 ($P = 0,005$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije proupalnog citokina $TNF\alpha$ ($P=0,001$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs879922 gena *ACE2*. Nositelji alelne kombinacije CC-CG u odnosu na GG imaju značajno više serumske vrijednosti $TNF\alpha$ (Slika 27).



Slika 27. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija $TNF\alpha$ ($P = 0,001$) u serumu

4.5.2 Rezultati analize povezanosti općih upalnih biljega -neutrofila, CRP-a i fibrinogena s polimorfizmima rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 u bolesnika s KOPB-om

Cilj ovih analiza bila jest utvrditi kako prisutnost odabranih polimorfni biljega utječe na status općih upalnih biljega. Analizirana je raspodjela vrijednosti općih upalnih biljega; neutrofila, CRP-a i fibrinogena ovisno o različitim genotipovima dvaju ispitivanih polimorfizama unutar gena ACE2 u skupini bolesnika s KOPB-om. Rezultati su prikazani kao odnos koncentracija navedenih ispitivanih parametara i alelnih varijantni polimorfizma. Prikazana je distribucija heterozigotnih i homozigotnih nosioca oba varijantna alela

4.5.2.1 SNP rs2285666 gena ACE2 i koncentracija neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu

Istraženo je da li prisutnost SNP-a rs2285666 gena ACE2 za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu ispitanika. Rezultati su prikazani u obliku tablice i slika.

Uočeno je da u testiranom polimorfizmu rs2285666 nositelji alelne kombinacije CC u odnosu na TT imaju značajno više vrijednosti neutrofila (Kruskal Wallis test, $P = 0,04$), neutrofila (%) (Kruskal Wallis test, $P = 0,02$) i CRP-a (Kruskal Wallis test, $P = 0,03$). Vrijednosti fibrinogena nisu se značajno razlikovale.

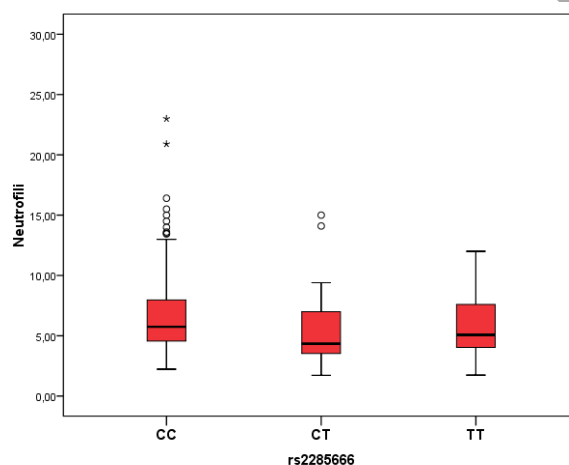
Tablica 10. Vrijednosti serumske koncentracije općih upalnih biljega neutrofila, CRP-a i fibrinogena ovisno o genotipu

rs2285666	Medijan (interkvartilni raspon)						P*
	N	CC	n	CT	N	TT	
Neutrofili	148	5,8 (4,6 – 7,9)	33	4,3 (3,5 – 7,1)	30	5,1 (4,0 – 7,6)	0,04[†]
Neutrofili (%)	148	68 (61 – 79)	33	60 (57 – 69)	30	64 (60 – 81)	0,02[†]
CRP	148	6,9 (2,4 – 33,7)	33	3,5 (1,4 – 6,2)	30	4,5 (1,6 – 22)	0,03[†]
Fibrinogen	145	4,1 (3,4 – 5,0)	33	3,8 (3,7 – 4,5)	30	4,1 (3,2 – 5,3)	0,66

*Kruskal Wallis test (post hoc Conover)

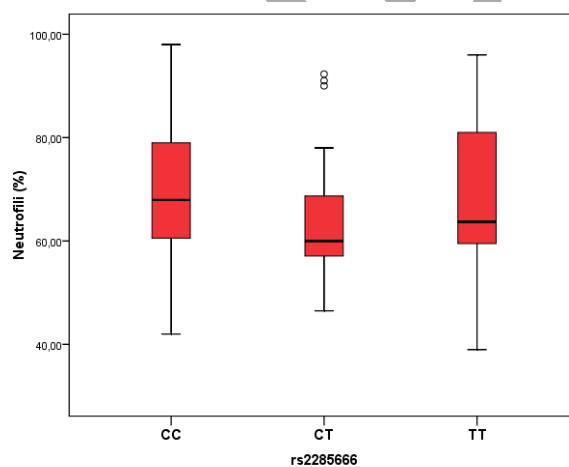
[†]na razini $P < 0,05$ značajno se razlikuje CC vs. CT

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije neutrofila ($P = 0,04$) za polimorfizam rs2285666 gena ACE2. Rezultati istraživanja prikazuju da nositelji alelna kombinacije CC u odnosu na TT imaju značajno više vrijednosti neutrofila (Slika 28).



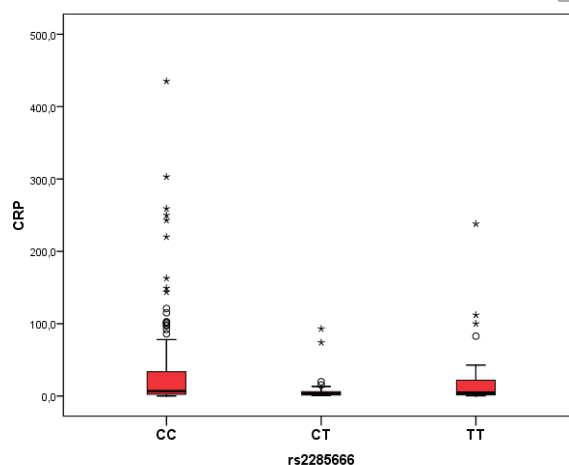
Slika 28. SNP rs2285666 gena ACE2 i vrijednosti neutrofila ($P=0,04$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije neutrofila % ($P = 0,02$) za polimorfizam rs2285666 gena ACE2. Rezultati istraživanja prikazuju da nositelji alelna kombinacije CC u odnosu na TT imaju značajno više koncentracije neutrofila % (Slika 29).



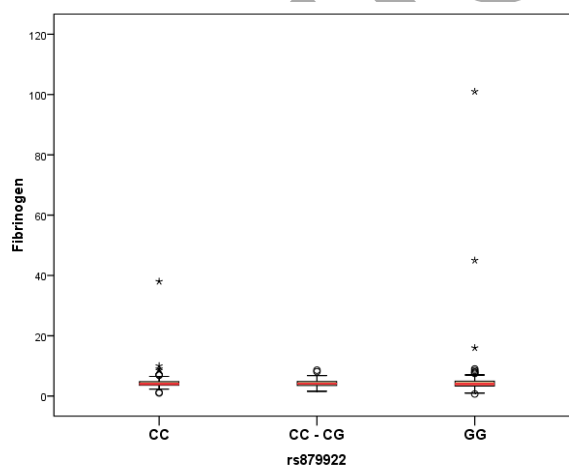
Slika 29. SNP rs2285666 gena ACE2 i koncentracija neutrofila % ($P=0,04$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije CRP-a ($P = 0,03$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2*. Rezultati istraživanja prikazuju da nositelji alelne kombinacije CC u odnosu na TT imaju značajno više vrijednosti CRP-a (Slika 30).



Slika 30. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija CRP-a ($P=0,03$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije fibrinogena ($P = 0,66$) za polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* (Slika 31).



Slika 31. SNP rs2285666 gena *ACE2* i koncentracija fibrinogena ($P=0,66$) u serumu.

4.5.2.2 SNP rs2285666 u dominantnom genetičkom modelu gena

ACE2 i vrijednosti općih upalnih biljega – neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu

U ovom dijelu istraženo je da li u dominantnom genetičkom modelu prisutnost SNP-a rs2285666 gena *ACE2* za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu ispitanika. Rezultati su prikazani u obliku tablice i slika.

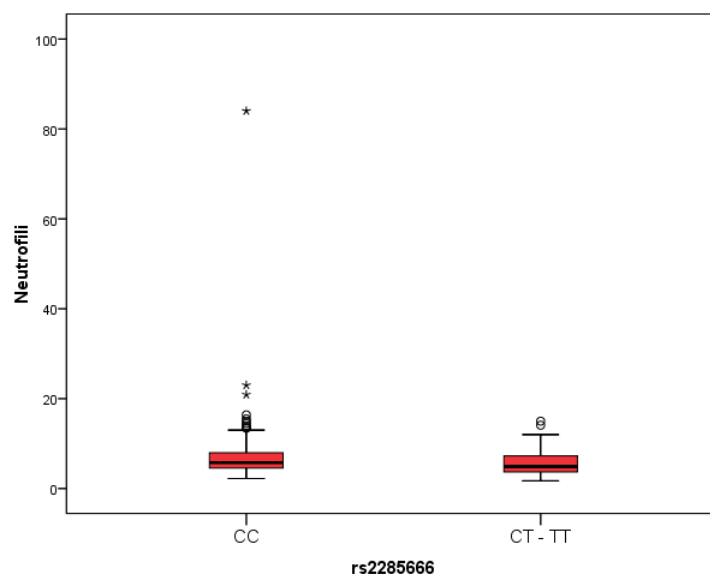
Rezultati istraživanja pokazuju da je u dominantnom genetičkom modelu prisutnost polimorfizma rs2285666 unutar gena *ACE2* u bolesnika s KOPB-om značajno povezana sa nižim vrijednostima neutrofila, neutrofila (%) i CRP-a za alelne kombinacije CT-TT, osim za fibrinogen, gdje se ne uočava značajna razlika između homozigotne i heterozigotne alelne kombinacije (Tablica 11).

Tablica 11. Vrijednosti neutrofila, CRP-a i fibrinogena ovisno o genotipu u dominantnom genetičkom modelu SNP-ova gena *ACE2*

<i>rs2285666</i>	N	Medijan (interkvartilni raspon)			Razlika	95% raspon pouzdanosti	<i>P</i> *
		CC	n	CT - TT			
Neutrofili	148	5,8 (4,6 – 7,9)	63	4,9 (3,7 – 7,4)	-0,9	-1,6 do -0,2	0,02
Neutrofili (%)	148	68 (61 – 79)	63	63 (57 – 75)	-4	-8 do -0,4	0,02
CRP	148	6,9 (2,4 – 33,7)	63	3,6 (1,5 – 11,9)	-1,9	-4,7 do -0,3	0,01
Fibrinogen	145	4,1 (3,4 – 5,0)	63	3,9 (3,4 – 4,6)	-0,1	-0,5 do 0,2	0,42

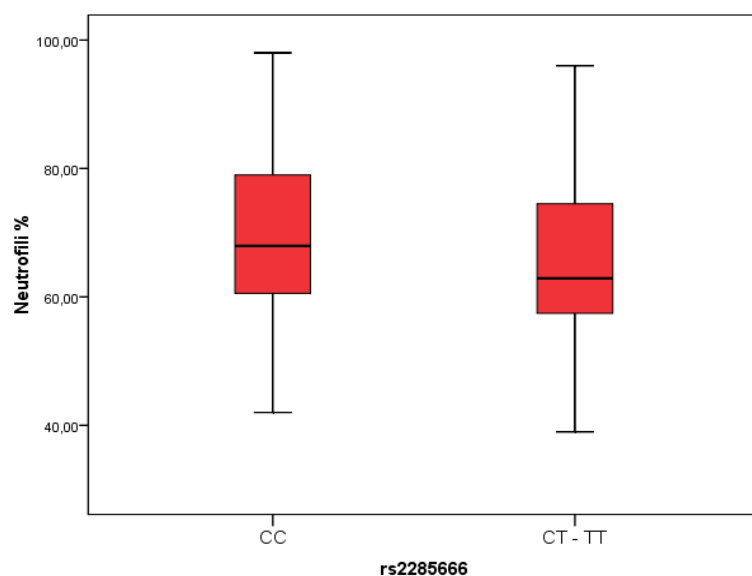
*Mann Whitney U test

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije neutrofila ($P = 0,02$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs2285666 gena *ACE2*. Nositelji alelne kombinacije CT-TT u odnosu na CC imaju značajno niže serumske vrijednosti neutrofila (Slika 32).



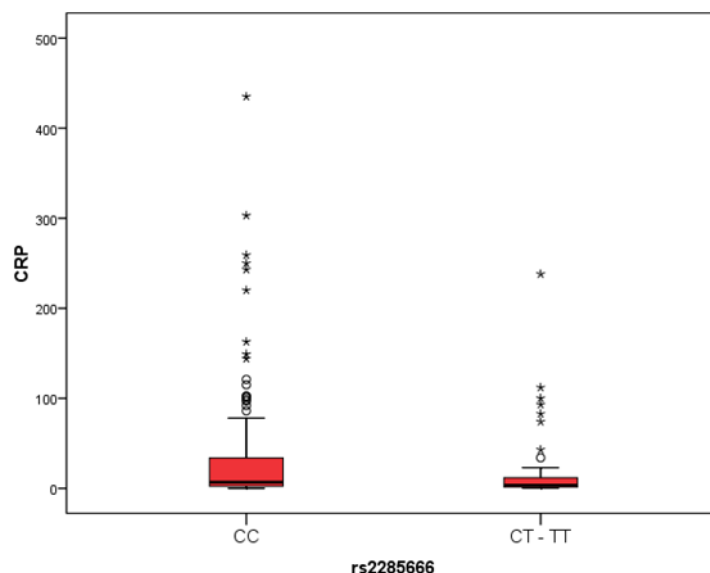
Slika 32. SNP rs2285666 gena *ACE2* i vrijednosti neutrofila ($P = 0,02$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije neutrofila (%) ($P = 0,02$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs2285666 gena *ACE2*. Nositelji alelene kombinacije CT-TT u odnosu na CC imaju značajno niže serumske vrijednosti neutrofila (Slika 33).



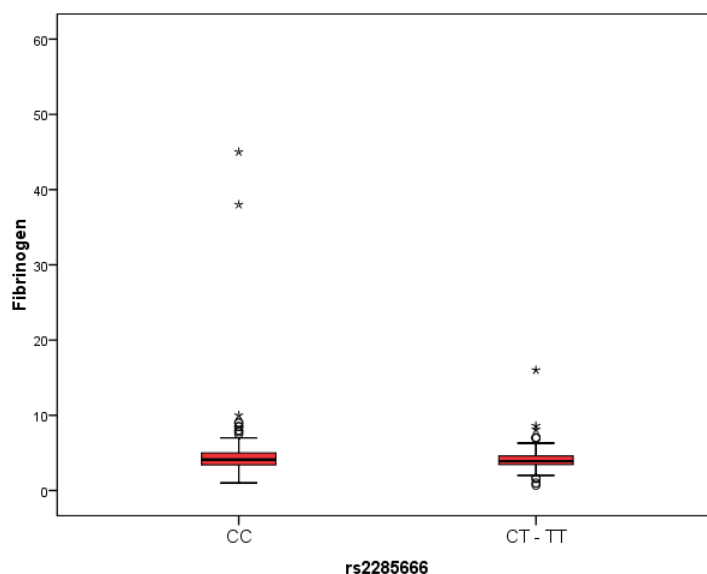
Slika 33. SNP rs2285666 gena *ACE2* i vrijednosti neutrofila % ($P = 0,02$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije CRP-a ($P = 0,01$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs2285666 gena *ACE2*. Nositelji alelene kombinacije CT-TT u odnosu na CC imaju značajno niže serumske vrijednosti CRP-a (Slika 34).



Slika 34. SNP rs2285666 gena *ACE2* i vrijednosti CRP-a ($P = 0,01$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije fibrinogena ($P = 0,42$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs2285666 gena *ACE2* (Slika 35).



Slika 35. SNP rs2285666 gena ACE2 i vrijednosti fibrinogena ($P = 0,42$) u serumu

4.5.2.3 SNP rs879922 gena ACE2 i koncentracija neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu

Istraženo je da li prisutnost SNP-a rs879922 gena ACE2 za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu ispitanika. Rezultati su prikazani u obliku tablice i slika.

U polimorfizmu rs879922, nositelji genotipa CG u odnosu na genotipove CC i GG imaju značajno niže vrijednosti neutrofila (Kruskal Wallis test, $P = 0,04$) dok u ostalim vrijednostima obzirom na genotip nema značajnih razlika (Tablica 12 i Slike 36, 37, 38, 39).

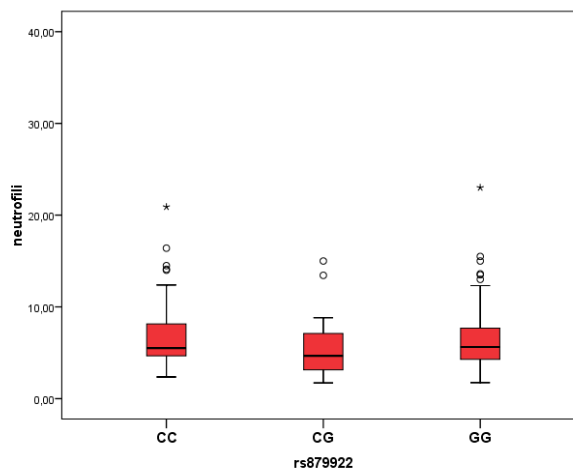
Tablica 12. Vrijednosti serumske koncentracije općih upalnih biljega neutrofila, CRP-a i fibrinogena ovisno o genotipu

rs879922	N	Medijan (interkvartilni raspon)				n	GG	P*
		CC	N	CG				
Neutrofili	72	5,5 (4,7 – 20,9)	35	4,7 (3,1 – 7,2)	117	5,6 (4,3 – 7,7)	0,04[‡]	
Neutrofili (%)	72	67,2 (60 – 80)	35	63 (57 – 71)	117	67 (60 – 78)	0,13	
CRP	72	6,3 (1,9 – 29,3)	35	3,9 (1,5 – 14,7)	117	5,5 (2,4 – 30,3)	0,53	
Fibrinogen	70	4,1 (3,6 – 4,8)	35	4,1 (3,5 – 4,9)	116	4,0 (3,3 – 5,0)	0,83	

*Kruskal Wallis test (post hoc Conover)

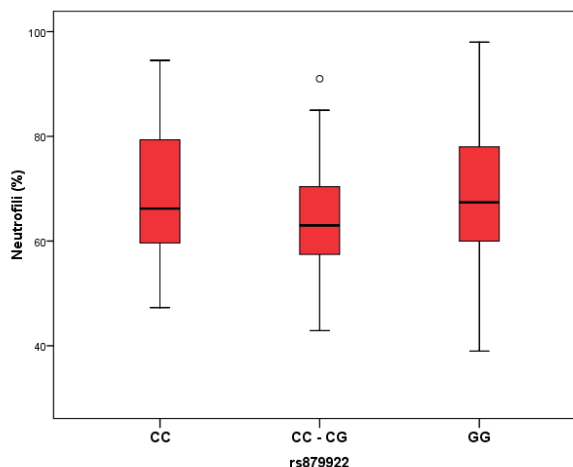
[‡]na razini $P < 0,05$ značajno se razlikuje CG vs. (CC i GG)

Rezultati istraživanja pokazuju da je nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije neutrofila ($P = 0,04$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2*. Rezultati prikazuju da nositelji genotipa CG u odnosu na genotipove CC i GG imaju značajno niže vrijednosti neutrofila (Slika 36).



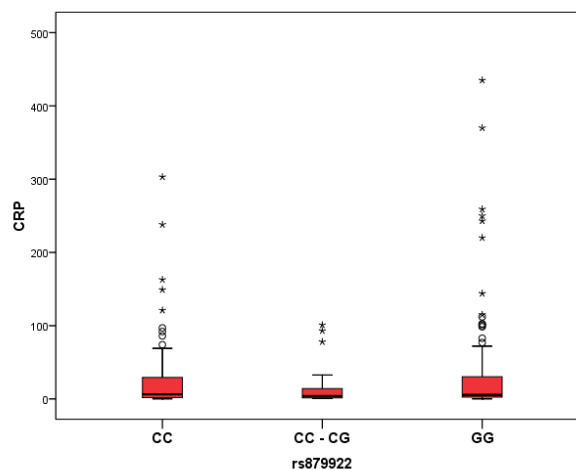
Slika 36. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija neutrofila ($P=0,04$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije neutrofila % ($P = 0,13$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2* (Slika 37).



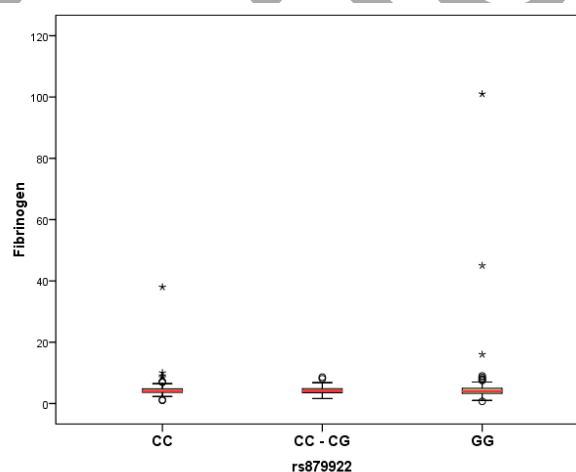
Slika 37. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija neutrofila % ($P=0,13$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije CRP-a ($P = 0,53$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2* (Slika 38).



Slika 38. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija CRP-a ($P=0,53$) u serumu.

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađena značajna razlika u vrijednosti serumske koncentracije fibrinogena ($P = 0,83$) za polimorfizam rs879922 gena *ACE2* (Slika 39).



Slika 39. SNP rs879922 gena *ACE2* i koncentracija fibrinogena ($P=0,83$) u serumu.

4.5.2.4 SNP rs879922 u dominantnom genetičkom modelu gena *ACE2* i

vrijednosti općih upalnih biljega – neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu

Istraženo je da li u dominantnom genetičkom modelu prisutnost SNP-a rs879922 gena *ACE2* za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za nastanak KOPB-a utječe na koncentraciju neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu ispitanika. Rezultati su prikazani u obliku tablice i slika.

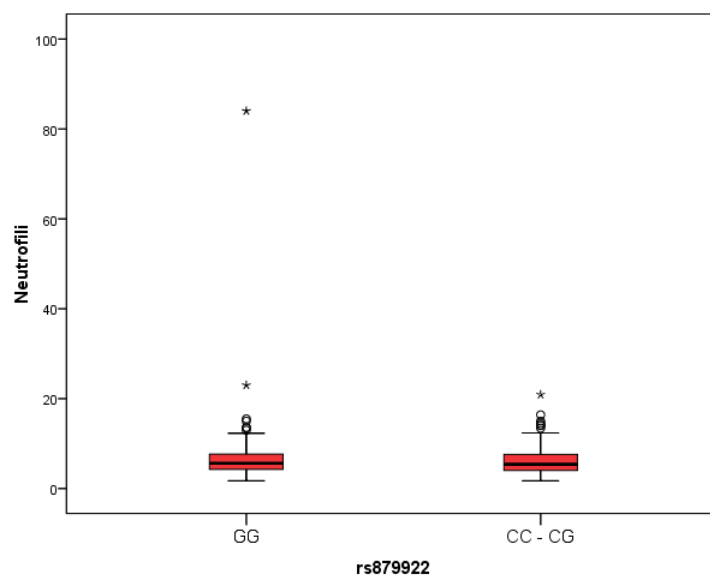
Rezultati pokazuju da niti u dominantnom genetičkom modelu prisutnost polimorfizma rs879922 ne utječe na koncentracije neutrofila, CRP-a i fibrinogena u serumu bolesnika s KOPB-om (Tablica 13, Slike 40, 41, 42, 43).

Tablica 13. Vrijednosti neutrofila, CRP-a i fibrinogena ovisno o genotipu u dominantnom genetičkom modelu SNP-ova gena *ACE2*

rs879922	Medijan (interkvartilni raspon)				Razlika	95% raspon pouzdanosti	P*
	N	GG	n	CC - GC			
Neutrofili	117	5,6 (4,3 – 7,7)	107	5,4 (4,0 – 7,6)	-0,2	-0,8 do 0,5	0,56
Neutrofili (%)	117	67 (60 – 78)	107	65 (59 – 78)	-1,5	-4,8 do 2	0,40
CRP	117	5,5 (2,4 – 30,3)	107	5,2 (1,7 – 23)	-0,3	-1,8 do 1,1	0,68
Fibrinogen	116	4,0 (3,3 – 5,0)	105	4,1 (3,5 – 4,8)	0,1	-0,2 do 0,4	0,54

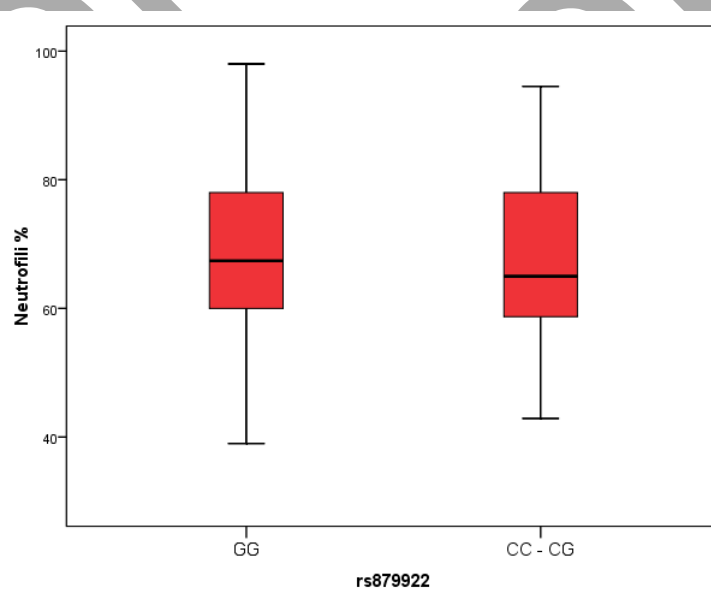
*Mann Whitney U test

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti neutrofila ($P = 0,56$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs879922 gena *ACE2* (Slika 40).



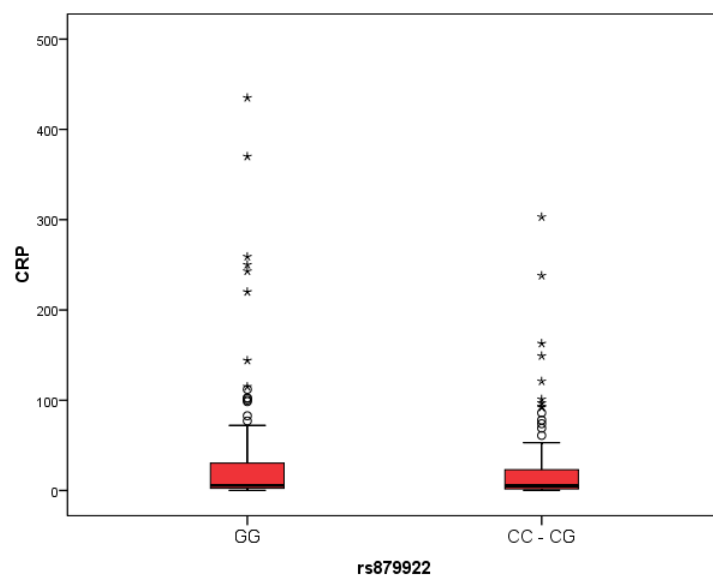
Slika 40. SNP rs879922 gena *ACE2* i vrijednost neutrofila ($P = 0,56$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti neutrofila (%) ($P = 0,40$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs879922 gena *ACE2* (Slika 41).



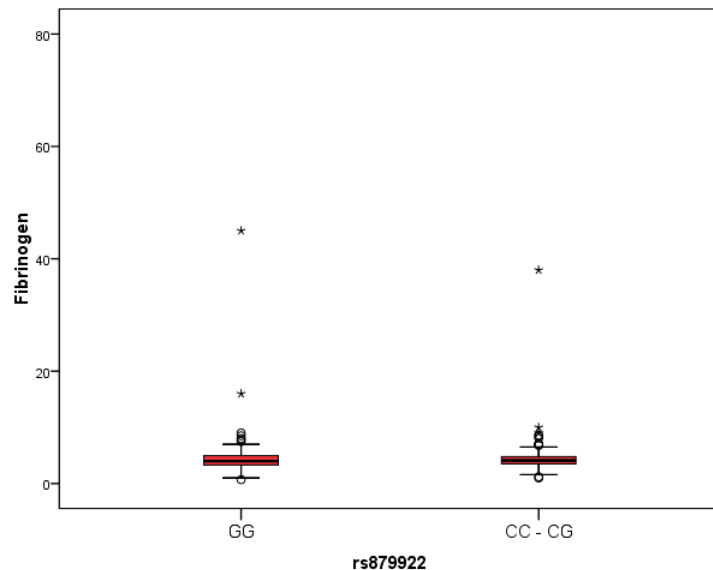
Slika 41. SNP rs879922 gena *ACE2* i vrijednost neutrofila (%) ($P = 0,40$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti CRP-a ($P = 0,68$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs879922 gena *ACE2* (Slika 42).



Slika 42. SNP rs879922 gena *ACE2* i vrijednost CRP-a ($P = 0,68$) u serumu

Rezultati istraživanja pokazuju da nije nađeno značajne razlike u vrijednosti fibrinogena ($P = 0,54$) u dominantnom genetičkom modelu polimorfizma rs879922 gena *ACE2* (Slika 43).



Slika 43. SNP rs879922 gena *ACE2* i vrijednost fibrinogena ($P = 0,54$) u serumu

4.5.3 Rezultati analize povezanosti testiranih polimorfizama rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 sa fenotipskim obilježjima KOPB-a (plućna funkcija)

Cilj ove analize bio je ispitati povezanost analiziranih polimorfizama sa kliničkim karakteristikama ispitanika obzirom da smo za oba testirana polimorfizma utvrdili da su povezani s razvojem KOPB-a. Kliničke karakteristike ispitanika ispitivali smo kroz objektivizaciju parametara plućne funkcije (FEV₁ i FVC) u bolesnika koji boluju od KOPB-a, te težinu bolesti prema GOLD stadiju.

4.5.3.1 Rezultati analize povezanosti parametara plućne funkcije (FEV₁ i FVC) s polimorfizmima rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 u bolesnika s KOPB-om

U ovome dijelu prikazujemo rezultate istraživanja povezanosti vrijednosti forsiranog vitalnog kapaciteta pluća (FVC) i forsiranog izdisajnog volumena u prvoj sekundi (FEV₁ %) s raspodjelom različitih genotipova dva testirana SNP-a rs2285666 i rs879922 unutar gena ACE2 u skupini bolesnika s KOPB-om. Rezultati su prikazani u obliku tablice.

Rezultati analize pokazuju da heterozigotni nositelji alelne kombinacije CT u polimorfizmu rs2285666 imaju značajno niže vrijednosti FVC u odnosu na homozigotnu alelnu kombinaciju CC i TT (Kruskal Wallis test, $P = 0,005$), dok za vrijednosti FEV₁ (%) nema značajnih razlika prema genotipu (Tablica 14).

U polimorfizmu rs879922, nositelji heterozigotne kombinacije alela CG imaju značajno niže vrijednosti FVC-a (Kruskal Wallis test, $P < 0,001$) u odnosu na homozigotnu kombinaciju CC i GG, dok za vrijednosti FEV₁ (%) nema značajnih razlika prema genotipu (Tablica 14).

Tablica 14. Vrijednosti parametara plućne funkcije ovisno o genotipu oboljelih od KOPB-a

		Medijan (interkvartilni raspon)					<i>P</i> *
		N	CC	n	CT	n	TT
rs2285666							
FVC	66	2,36 (1,72 - 2,98)	18	1,87 (1,25 - 2,28)	13	2,52 (2,09 - 3,23)	0,005[†]
FEV ₁ (%)	168	44 (28,3 - 62)	33	35 (26,95 - 62,1)	27	53,6 (35,5 - 66,7)	0,12
rs879922							
FVC	36	2,57 (1,77 - 3,3)	16	1,59 (1,17 - 2,2)	48	2,4 (1,82 - 2,76)	<0,001[‡]
FEV ₁ (%)	76	49,35 (32,38 - 67,4)	35	36,5 (26,7 - 62,3)	123	43,4 (27,3 - 59,8)	0,11

*Kruskal Wallis test (post hoc Conover)

[†]na razini $P < 0,05$ značajno se razlikuje CT vs. (CC i TT)[‡]na razini $P < 0,05$ značajno se razlikuje CG vs. (CC i GG)

4.5.3.2 Rezultati analize povezanosti težine bolesti prema GOLD klasifikaciji s polimorfizama rs2285666 i rs879922 unutar gena *ACE2* u bolesnika s KOPB-om

U ovome dijelu prikazujemo rezultate istraživanja povezanosti težine bolesti prema GOLD klasifikaciji s raspodjelom različitih genotipova dva testirana SNP-a rs2285666 i rs879922 unutar gena *ACE2* u skupini bolesnika s KOPB-om. Rezultati su prikazani u obliku tablice.

Rezultati istraživanja pokazuju da nema značajnih razlika u raspodjeli genotipova oba testirana polimorfizma rs2285666 i rs879922 unutar gena *ACE2* u odnosu na težinu bolesti prema GOLD klasifikaciji (Tablica 15).

Tablica 15. Raspodjela i učestalost genotipova dva SNP-a gena *ACE2* u odnosu na težinu bolesti prema GOLD klasifikaciji

	Genotip [n (%)] prema GOLD klasifikaciji					P*
	GOLD 1 (n = 12)	GOLD 2 (n = 83)	GOLD 3 (n = 69)	GOLD 4 (n = 64)	Ukupno (n = 228)	
rs2285666						
CC	8 (67)	58 (70)	53 (77)	49 (77)	168 (74)	0,17
CT	2 (17)	11 (13)	7 (10,1)	13 (20)	33 (15)	
TT	2 (17)	14 (17)	9 (13)	2 (3)	27 (12)	
rs879922	(n = 15)	(n = 84)	(n = 69)	(n = 66)	(n = 234)	
CC	9 (60)	28 (33)	24 (35)	15 (23)	76 (33)	0,12
GC	2 (13)	11 (13)	8 (11,6)	14 (21)	35 (15)	
GG	4 (27)	45 (54)	37 (54)	37 (56)	123 (53)	

* χ^2 test

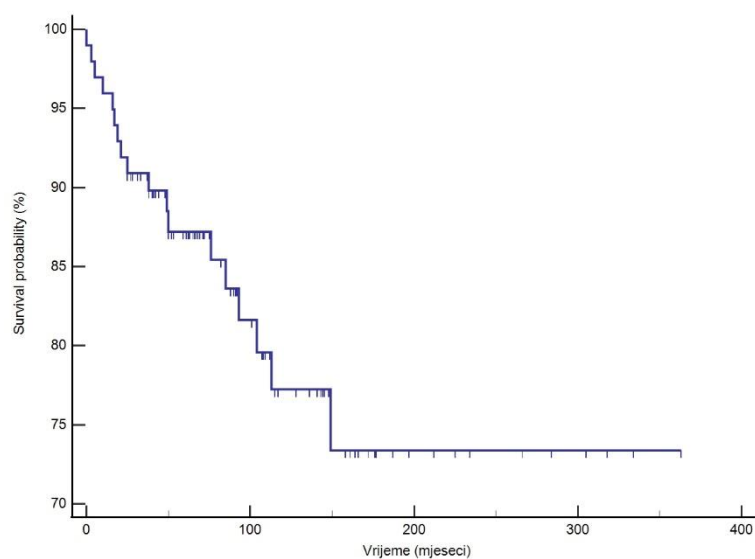
4.6 Preživljenje bolesnika s KOPB-om u odnosu na varijante gena *ACE2*

Cilj ove analize bio je ispitati ukupno preživljenje ciljane skupine ispitanika s KOPB-om. Osim ukupnog preživljenja ispitati smo utječe li prisutnost ispitivanih polimorfizama rs2285666 i rs879922 gena *ACE2* na preživljenje bolesnika koji boluju od KOPB-a. Navedeno je istraženo i za dominantni genetički model oba ispitivana polimorfizma rs2285666 i rs879922 gena *ACE2* za koje je utvrđeno da su povezani sa rizikom za nastanak KOPB-a.

Rezultati istraživanja pokazuju da je ukupno preživljenje bolesnika oboljelih od KOPB-a 73,4 % s aritmetičkom sredinom 284 mjeseci (uz 95% raspon pouzdanosti 251 – 318 mjeseci). Navedeni rezultati prikazani su tablicom i Kaplan – Meierovom krivuljom (Tablica 16. i Slika 44).

Tablica 16. Ukupno preživljenje bolesnika s KOPB-om

	Umrli	Živi	Preživljenje	Aritmetička sredina (95% CI)	Medijan (95% CI)
Ukupno preživljenje (mjeseci)	18	81	73,4 %	284 (251 – 318)	-

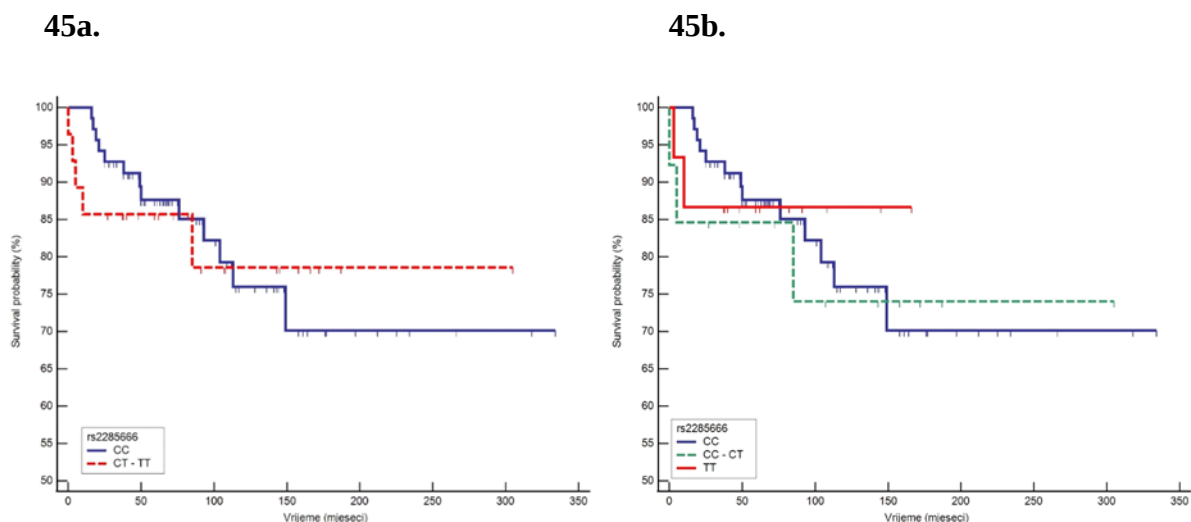


Slika 44. Kaplan – Meierova krivulja ukupnog preživljenja oboljelih od KOPB-a

Rezultati istraživanja pokazuju da nema značajnih razlika u preživljenju u bolesnika s KOPB-om, obzirom na prisutnost polimorfizma rs2285666 *ACE2* gena. Nisu zabilježene niti razlike u preživljenju za alelne kombinacije u dominantnom modelu nasljeđivanja (Tablica 17. i Slike 45a i 45b).

Tablica 17. Preživljenje bolesnika s KOPB-om u odnosu na prisutnost polimorfizma rs2285666

<i>rs2285666</i>	Umrli	Živi	Preživljenje	Aritmetička sredina (95% CI)	Medijan (95% CI)	Log – rank test
Preživljenje						
CC	13	56	70,1 %	258 (221 – 296)	-	0,97
CT	3	10	74,0 %	235 (166 – 304)	-	
TT	2	13	86,7 %	145 (117 – 172)	-	
Preživljenje						
CC	13	56	70,1 %	258/ (221 – 296)	-	0,90
CT – TT	5	23	72,3 %	246 (199 – 293)	-	



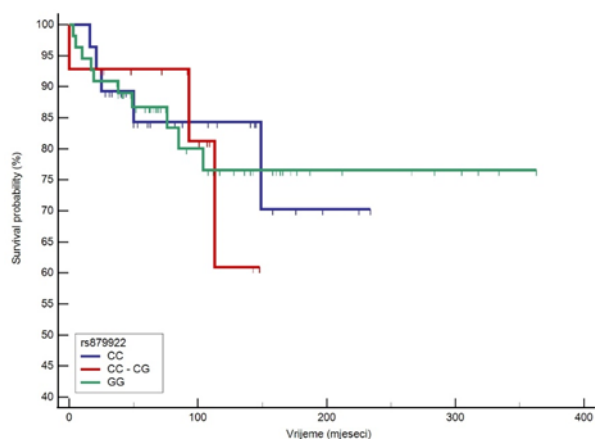
Slika 45a i 45b. Kaplan – Meierove krivulje preživljenja s obzirom na prisutnost polimorfizma rs2285666 kod podjele na CC/CT-TT (45 a) i na podjelu CC/CC-CT/TT (45 b)

Rezultati istraživanja pokazuju da nema značajnih razlika u preživljenju u bolesnika s KOPB-om, obzirom na prisutnost polimorfizma rs879922 gena ACE2. Nisu zabilježene niti razlike u preživljenju za alelne kombinacije u dominantnom modelu nasljeđivanja (Tablica 18. i Slika 46a i 46b).

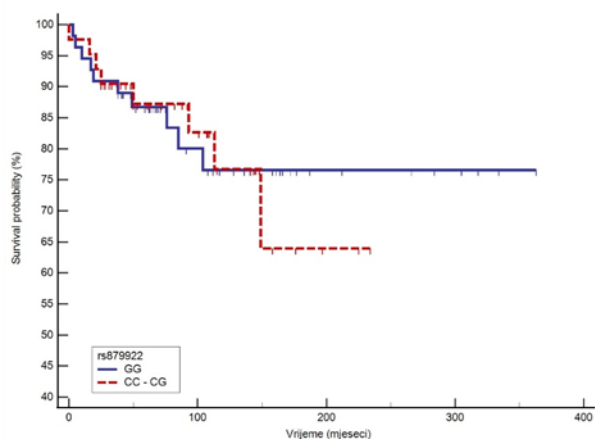
Tablica 18. Preživljenje bolesnika s KOPB-om u odnosu na prisutnost polimorfizma rs879922

rs879922	Umrli	Živi	Preživljenje	Aritmetička sredina (95% CI)	Medijan (95% CI)	Log – rank test
Preživljenje						
CC	5	23	70,3 %	190 (156 – 225)	-	0,95
CG	3	11	60,9 %	124 (100 – 148)	-	
GG	10	45	76,6 %	290 (249 – 331)	-	
Preživljenje						
GG	10	45	76,6 %	290 (249 – 331)	-	0,88
CG – CC	8	34	64,0 %	183 (151 – 214)	-	

46a.



46b.



Slika 46a i 46b. Kaplan – Meierove krivulje preživljenja oboljelih od KOPB-a s obzirom na prisutnost polimorfizma rs879922 kod podjele na CC/CC-CG/GG (46 a) i na podjelu GG/CC-CG (46 b)

5. RASPRAVA

KOPB je jedna od vodećih kroničnih plućnih bolesti današnjice. Učestalost je u stalnom porastu s varijacijama između spolova, različitih zemljopisnih regija, socio-ekonomskog statusa (34), a odnedavno je na trećem mjestu ukupne učestalosti od smrtnog ishoda nakon cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti. Štetni inhalacijski čimbenici od kojih dominira pušački staž u genetski predisponiranih pojedinaca, precipitirat će nastanak bolesti. Kronična upala s nakupljanjem proupalnih stanica i citokina u osnovi je patofiziološkog zbivanja. Ima značajan utjecaj na kvalitetu života. Unatoč svakodnevnom napretku, terapijske mogućnosti su ograničene, mehanizmi koji reguliraju upalu i progresiju bolesti nisu potpuno razjašnjeni. Novija istraživanja sugeriraju na genetsku predispoziciju kao mogući čimbenik za nastanak različitih fenotipova bolesti. Geni regulatori proupalnih zbivanja svakodnevno se istražuju a jedan od potencijalnih je gen *ACE2*. Poznat je po regulaciji RAAS-a i imunoloških odgovora, te potencijalno ima važnu ulogu u patogenezi KOPB-a (100). Prema dosadašnjim saznanjima istoimeni protein *ACE2* dio je RAAS kaskade, djeluje kao protuteža svim štetnim učincima aktivacije RAAS-a, smanjuje aktivaciju proupalne kaskade i čini ga potencijalnim čuvarom pluća. U cilju boljeg razumijevanja etiopatogeneze KOPB-a u ovom smo istraživanju pretpostavili da bi proučavanjem polimorfizama gena *ACE2* mogli pridonijeti boljem razumijevanju genetskih faktora koji moduliraju upalne procese u bolesnika s KOPB-om.

Istraživanjem u sklopu izrade ove disertacije analizirana je povezanost polimorfizama rs2285666 i rs879922 u genu *ACE2* sa pojavnošću KOPB-a, sistemskim upalnim odgovorom i kliničkim ishodima. Rezultati sugeriraju na značajne razlike u distribuciji genotipova između dvije praćene skupine – zdrave kontrolne skupine i bolesnika s KOPB-om. Polimorfizam rs2285666 pokazao je značajnu povezanost s KOPB-om, pri čemu je heterozigotna alelna kombinacija CT bila učestalija u bolesnika s KOPB-om. Dominantni i superdominantni model (CT-TT i CT) ovog polimorfizma pokazali su se povezani s rizikom obolijevanja od KOPB-a za 1,06 do 5,5 puta. Drugi analizirani polimorfizam, rs879922 pokazao je značajnu povezanost s KOPB-om samo u superdominantnom modelu nasljeđivanja (GC). Analiza koncentracije upalnih biomarkera otkrila je razlike između polimorfizama. Polimorfizam rs2285666 nije pokazao značajnu povezanost s citokinima, ali je bio povezan s povišenim razinama neutrofila i CRP-a. Polimorfizam rs879922 pokazao je pozitivnu korelaciju s višim razinama proupalnih citokina IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α te povezanost s neutrofilima. Niti jedan testirani polimorfizam nije pokazao značajnu povezanost s plućnom funkcijom (FEV1), niti s preživljenjem bolesnika. Navedeno nam sugerira da iako mogu utjecati na upalni odgovor, ne

odražavaju nužno progresiju bolesti ili dugoročni klinički ishod. Ekspresijska analiza ACE2 nije bila moguća zbog niske razine ekspresije u uzorcima.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su statistički značajne razlike između dviju ispitivanih skupina, što je u skladu s prethodnim istraživanjima i epidemiološkim podacima o KOPB-u. Bolesnici s KOPB-om u pravilu su starije životne dobi, što potvrđuje i naše istraživanje. Naši su podaci potvrdili kako su bolesnici s KOPB-om u pravilu starije životne dobi, što je očekivano s obzirom na prirodu bolesti koja nastaje kao posljedica dugotrajnog izlaganja duhanskom dimu i drugim zagađivačima zraka (179) (180). Zanimljivo, u našem uzorku prevladavale su žene, što se razlikuje od tradicionalnog shvaćanja KOPB-a kao bolesti koja češće pogađa muškarce, što se dosad pripisivalo učestalijem pušenju među muškarcima. Međutim, noviji epidemiološki podaci ukazuju na sve češću pojavnost KOPB-a među ženama, osobito u urbanim sredinama i zemljama s visokim dohotkom, kao što je navedeno u najnovijem GOLD izvješću za 2025. godinu. Važno je napomenuti da se gen ACE2, čiji polimorfizmi čine predmet našeg istraživanja, nalazi na kromosomu X. Time postaje relevantno promatrati spolnu distribuciju ispitanika, s obzirom na mogućnost različitog fenotipskog izražaja između žena i muškaraca. Iako teorijski dvostruki kromosom X kod žena može pružiti zaštitni učinak zahvaljujući funkcionalnoj rezervi, epidemiološki podaci ukazuju da su žene zapravo osjetljivije na štetno djelovanje duhanskog dima, imaju raniji početak bolesti i brži razvoj respiratorne insuficijencije (181)(182). Velika studija koja je obuhvatila 17.139 bolesnika iz 22 kohorte pokazala je da su žene s KOPB-om bile mlađe, imale manji pušački staž, ali su imale učestalije egzacerbacije u usporedbi s muškarcima (183). Budući da samo 20% pušača razvije KOPB, jasno je da u etiologiji bolesti sudjeluju i drugi čimbenici. Kod dijela oboljelih, posebice nepušača, uzrok ostaje nejasan, što otvara prostor za razmatranje genetskih utjecaja, uključujući X-vezano nasljeđivanje i ulogu ACE2 polimorfizama u nastanku bolesti (184). Pušački status pokazao se kao ključni čimbenik u našoj studiji. Najviše je bivših pušača, od kojih su značajno svi s KOPB-om, dok su nepušači zastupljeniji u kontrolnoj skupini. Pušački status pokazao se kao važan čimbenik u našoj studiji. Većinu ispitanika činili su bivši pušači, među kojima su svi bolesnici imali dijagnosticiran KOPB. S druge strane, nepušači su bili značajno zastupljeniji u kontrolnoj skupini.

Analiza plućne funkcije pokazala je da su bolesnici bili raspoređeni prema stupnjevima bolesti sukladno GOLD kriterijima. Najveći broj ispitanika imao je umjereni stupanj opstrukcije (GOLD 2), dok su teški i vrlo teški oblici (GOLD 3 i 4) bili prisutni u značajnom

postotku. Ovakav raspored odražava tipičnu progresiju bolesti, pri čemu se KOPB često dijagnosticira tek u uznapređenoj fazi. Laboratorijska analiza upalnih parametara, uključujući serumske koncentracije proupalnih citokina, neutrofila, CRP-a i fibrinogena, pokazala je širok raspon vrijednosti među oboljelima.

Dosadašnja istraživanja pokazala su da ACE2 ima značajnu ulogu u regulaciji upale u organizmu te održavanju homeostaze u plućima. Gen *ACE2* zadnjih godina predmet je istraživanja zbog svoje uloge u različitim plućnim bolestima, ponajprije COVID 19 bolesti, astmi i intersticijskoj bolesti pluća. Uloga gena *ACE2* u modulaciji RAAS -a sugerirala je moguću ulogu genetskih varijacija unutar gena na razvoj i progresiju KOPB-a. Pregledom literature uočili smo da su podaci o specifičnim polimorfizmima unutar gena *ACE2* u KOPB-u ograničeni. Nismo našli niti jednu studiju koja se bavi navedenima. Polimorfizam rs2285666 povezan je s regulacijom ekspresije ACE2 u različitim populacijama, ali podaci o njegovoj ulozi u KOPB-u su rijetki. Pretraživanjem literature ciljajući na polimorfizme koji su predmet naše studije pronašli smo rezultate koji polimorfizam rs2285666 gena *ACE2* povezuju s protektivnim učinkom od smrtnosti od teških kardiovaskularnih incidenata u populaciji žena (185), rizikom od esencijalne hipertenzije (186) rizikom od dijabetesa tipa 2 i moždanog udara u bolesnika sa dijabetesom melitusom tip 2 (187). Naime, dosadašnja istraživanja navode da ovaj polimorfizam može utjecati na proces alternativnog spajanja mRNA te na taj način utjecati na promjenu razine ekspresije gena *ACE2*. Istraživanja pokazuju da je alel A povezan sa višim vrijednostima ACE2 u serumu zdravih osoba. Povezuju ovaj polimorfizam s dijabetesom, moždanim udarom, koronarnom bolesti i hipertenzijom (188) (189). Povezuju ga s povećanim rizikom od SARS-CoV-2 infekcije i težim oblicima COVID 19 bolesti, iako su rezultati različiti među populacijama (165). Naime, distribucija ovoga polimorfizma varira između etničkih skupina, što može objasniti razlike u učestalosti bolesti (175). U našem istraživanju polimorfizam rs2285666 iako je pokazao pozitivnu korelaciju s KOPB-om, nije pokazao povezanost s proupalnim citokinima ali jest sa koncentracijom neutrofila i CRP-a. Iako je u istraživanjima korelirao sa težim ishodom od COVID 19, također nije bilo jasnih dokaza o njegovoj izravnoj povezanosti s razinama proupalnih citokina. Navedeno može biti zbog složenijih mehanizama koji su u podlozi ili utjecaja okolišnih čimbenika koji moduliraju njegovu funkciju. Ovo istraživanje doprinosi novom saznanju o potencijalnoj ulozi u patogenezi bolesti. Nasuprot tome, polimorfizam rs879922 koji se u našem istraživanju pokazao povezan s KOPB-om, pokazao je i korelaciju s povećanim razinama IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α . Iako ne postoje radovi koji pružaju jasnu povezanost ovog polimorfizma u genu *ACE2* s razinama

proupalnih citokina naše istraživanje ukazuje na njegovu moguću povezanost s ekspresijom proupalnih citokina u bolesnika s KOPB-om što je u skladu s prethodnim studijama koje su ukazivale na proinflamatorne učinke ACE2 u određenim kontekstima (190) (191). Dosadašnja saznanja navode i dvostruku ulogu ACE2 u kome aktivacija može suprimirati upalnu, dok neki polimorfizmi unutar gena mogu dovesti do neravnoteže u RAAS-u pridonoseći kroničnom upalnom procesu (192). Ovi rezultati ukazuju da ipak, unatoč do sada naglašavanom protektivnom učinku ACE2 zbog svog utjecaja na angiotenzin II signalizaciju u plućima, određeni polimorfizmi mogu modulirati upalni odgovor doprinoseći progresiji bolesti. Razlike u navedenome mogu biti povezane s genetskom heterogenosti ispitanika, okolišnim čimbenicima (pušenje ili zagađenje zraka) ili samim konceptom istraživanja. Nadalje, varijacije u učestalosti ovih polimorfizama među etničkim skupinama također mogu također mogu pridonijeti razlikama. Rezultati naše studije pokazuju da prisutnost određenog polimorfizma određuje citokinski sastav što ukazuje da bi tijek i težina bolesti mogla biti predisponirana genetskim zapisom. Do sada prema našim saznanjima ne postoji istraživanje kojim je isto navedeno potvrđeno. Ukoliko bi se isto potvrdilo u narednim istraživanjima mogle bi se ciljanjem na genetički zapis ipak puno ranije predvidjeti nastanak KOPB-a te ranim intervencijama spriječiti nastanak bolesti. Naime, novija istraživanja u liječenju KOPB-a temeljena na boljem razumijevanju involviranosti citokina nagovješćuju biološku terapiju u liječenju KOPB-a (193). Pretražujući ostale komponente RAAS sustava koje su potencijalno uključene u patogenezu KOPB-a nailazimo na radove koji istražuju polimorfizme unutar gena ACE te istražuju njihovu poveznicu sa KOPB-om. Dosadašnje studije uglavnom su rađene na malom broju uzoraka a rezultati istraživanja su oprečni. Iako neki autori u svojim radovima niječu utjecaj polimorfizama unutar gena *ACE* za nastanak KOPB-a, Budquets, Kirtipal i Simsek povezuju utjecaj polimorfizama unutar gena *ACE* s rizikom za nastanak KOPB-a (169) (170) (171). Na tragu navedenoga potrebna su daljnja istraživanja.

Rezultati istraživanja u sklopu izrade ove disertacije kojima je cilj bio ispitati povezanost analiziranih polimorfnih biljega rs2285666 i rs879922 s parametrima plućne funkcije u KOPB bolesnika ukazuju da nema statistički značajne razlike prema genotipu za razlike u vrijednosti FEV1 (%) i omjer FEV1/FVC (%), odnosno za težinu bolesti prema GOLD klasifikaciji. Rezultati ipak ukazuju na razlike u vrijednostima FVC. Heterozigotni nositelji alelna kombinacije CT u polimorfizmu rs2285666 imaju značajno niže vrijednosti FVC u odnosu na homozigotnu alelnu kombinaciju CC i TT (Kruskal Wallis test, $P = 0,005$). U polimorfizmu rs879922, nositelji heterozigotne kombinacije alela CG imaju značajno niže

vrijednosti FVC-a (Kruskal Wallis test, $P < 0,001$) u odnosu na homozigotnu kombinaciju CC i GG (Tablica 14). Pretraživanjem literature naišli smo na brojna istraživanja koja su do sada potvrdila preko 100 lokusa u genomu povezanih sa plućnom funkcijom koje autori nazivaju potencijalnim genima za KOPB. Navedeni lokusi pokazalo se u asocijacijskim studijama da koreliraju sa vrijednostima FEV1 odnosno FEV1/FVC kao parametrima koji se koriste za dijagnosticiranje i određivanje težine KOPB-a (194)(195)(196)(197) (198) (199) (200) (201) (202). Navedena istraživanja uglavnom nisu istraživala lokuse na X kromosomu. Povezanost između genetskih lokusa na X kromosomu i rizika od KOPB-a do sada nije u potpunosti istražena. Kada se u pretraživanju baziramo na lokuse smještene na X kromosomu kao i lokusi koji su predmet našeg istraživanja nailazimo na rezultate istraživanja Haydena i suradnika koji su pronašli korelaciju pojedinih lokusa X kromosoma u bolesnika s KOPB-om sa parametrima plućne funkcije (203). Vrijednosti FVC-a također su se pokazale značajnima u korelaciji sa KOPB-om u drugim asocijacijskim studijama, a kriju li se iza alelnih kombinacija sa sniženim vrijednostima FVC u našem istraživanju KOPB bolesnici fenotipa emfizema s afekcijom intersticija u daljnjem istraživanju moglo bi se istražiti. Dodatna genetska istraživanja s uključivanjem gena smještenih na X kromosomu mogla bi doprinijeti boljem razumijevanju spolnih razlika u KOPB-u.

Kao dodatak istraživanju u sklopu izrade ove doktorske disertacije istražili smo preživljenje bolesnika s KOPB-om u odnosu na varijante gena *ACE2* te prema dobivenim rezultatima u našem istraživanju nije nađeno značajnih razlika. Sličnih istraživanja nismo našli te nismo mogli niti provesti korelacije. Uspjeli smo pronaći slična istraživanja u bolesnika s COVID 19 bolesti. Pozitivna korelacija polimorfizma rs2285666 s preživljenjem u bolesnika s COVID 19 bolesti pokazana je u radu iranskih autora u kojemu navode da su pacijenti s genotipom *ACE2* rs2285666 CC bili izloženi većem riziku od smrti od COVID-19 od TT genotipa (204)što korelira sa rezultatima drugih istraživanja (205) (206). Međutim, učinak ovog SNP-a na težinu bolesti ili stopu smrtnosti od COVID-19 u radovima Gomeza i Karakasa nije pronađen (207)(208). Nevedena razlika može biti povezana s veličinom uzorka ili posljedica etničkih razlika između skupina, no nema dokaza da su polimorfizmi gena *ACE2* izravno povezani s težinom COVID-19 (208). Ukupna istraživana populacija u navedenim istraživanjima jest premalena no značajan je podatak o mogućem utjecaju polimorfizma rs2285666 s preživljenjem u bolesnika s COVID 19 bolesti. U konačnici, budući da nismo našli radove u kojima je istraživana utjecaj polimorfizama gena *ACE2* u bolesnika s KOPB-om, navedeno ostavlja prostora za daljnja istraživanja.

Individualni pristup, traganje za fenotipovima i definiranje gena koji pridonose razvoju bolesti mogli bi poboljšati ishode liječenja. Individualna osjetljivost na nokse iz okoline čini se da je genetski definirana, a sklonost egzacerbacijama najbolje ilustrira važnost te predodređenosti. Ulaganje napora u istraživanje genetske podloge KOPB-a s ciljem ranog probira i individualnog pristupa liječenju čini se da bi moglo spriječiti uzlaznu putanju morbiditeta od ove bolesti. Naše istraživanje otvara jednu novu ideju kojom genetski faktori igraju ulogu u sistemskom upalnom odgovoru u bolesnika s KOPB-om, što bi moglo biti od kliničke važnosti. Identifikacija rizičnih genotipova mogla bi biti od pomoći u probiru pacijenata podložnih jačem upalnom odgovoru i potencijalno lošijim ishodima. Personalizirani pristup liječenju mogao bi omogućiti veću korist od protuupalne terapije bolesnicima sa genotipom u kojemu je uočena povećana razina proupalnih citokina kao što je u našem istraživanju polimorfizam rs879922. Odsutnost povezanosti s FEV1 i preživljenjem ukazuje da, iako polimorfizmi mogu utjecati na upalni odgovor, nisu nužno glavni prediktori progresije KOPB-a.

Kao i svako istraživanje i naša studija ima svoja ograničenja. Obuhvatila je populaciju KOPB bolesnika iz jednog respiratornog centra s relativnom malim brojem ispitanika. Iako su utvrđene značajne povezanosti potrebno je istraživanje na većem broju ispitanika kako bi se potvrdila snaga ovih nalaza. Žene su prednjačile u skupini ispitanika s KOPB-om što bi također obzirom na spolne razlike u učestalosti KOPB-a moglo imati utjecat na ovakve rezultate istraživanja. Utjecaj okolišnih faktora kao to su pušenje (većina ispitanika s KOPB-om uključenih u istraživanje u bivši pušači), komorbiditeti i izloženost zagađivačima nisu u potpunosti kontrolirani što može utjecati na rezultate. Potrebne su daljnje populacijske studije kako bi se utvrdilo ima li razlika u rezultatima među različitim etničkim skupinama koje obitavaju u različitim zemljopisnim područjima, uključujući profesionalnu i socijalnu anamnezu. Naša studija nije uspjela jasno razjasniti razlike u genskoj ekspresiji obzirom da smo imali poteškoća sa detekcijom ACE2 proteina. Nastavak ovoga/neko drugo istraživanje moglo bi upotpuniti navedene manjkavosti.

KOPB i dalje ostaje kompleksna bolest koju karakterizira velika klinička varijabilnost i nepostojanje jasno definiranih uniformiranih dijagnostičkih kriterija. Lancetova komisija u svom posljednjem izvješću također napominje promišljanje o heterogenosti KOPB-a, podsjećaju na potrebu definiranja boljih dijagnostičkih kriterija osim postbronhodilatatorne spirometrije za koju kažu da nije osjetljiva na rane patomorfološke promjene, često je pogrešno interpretirana te ne predviđa tijek bolesti. Znanstvenici smatraju da je potvrda opstrukcije kao

kriterija za dijagnozu bolesti prema sadašnjim preporukama ujedno znak nepovratnosti, a ranijim medikamentoznim intervencijama ovo stanje moglo bi se prolongirati. Navode da je terapija uniformirana unatoč jasnoj heterogenosti bolesti a ulaganja na svjetskoj razini u bolje razumijevanje patofiziologije bolesti, smanjenje utjecaja štetnih čimbenika i razvoja novih terapijskih metoda je nedostatna. Predlažu ispravniju klasifikaciju temeljenu na pet glavnih čimbenika rizika; genetike, događaja u ranoj životnoj dobi (prijevremeni porod, astma u djetinjstvu), plućne funkcije, plućnih infekcija (infekcije u dječjoj dobi, KOPB povezan s tuberkulozom i HIV-om), izloženosti duhanskim dimu, izloženost zagađenjima iz okoliša (209). Rezultati naše studije nose neke nove ideje za buduća istraživanja u ovome području. Analiza dodatnih polimorfizama unutar gena *ACE2* provođenjem većih genetskih studija mogla bi dati bolju sliku o genetskoj podlozi KOPB-a. Nastavak istraživanja kroz funkcionalne studije mogao bi istražiti kako polimorfizmi rs2285666 i rs879922 utječu na ekspresiju i funkciju *ACE2* i plućima. Potencijalna upotreba genetskih biomarkera i personalizirana terapija u predviđanju odgovora na protuupalnu terapiju mogla bi poboljšati kliničke ishode pacijenata s KOPB-om.

Navedeno istraživanje pruža nove dokaze o ulozi polimorfizama gena *ACE2* u patogenezi KOPB-a, ponajprije kroz regulaciju sistemskog upalnog odgovora.

6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati analize povezanosti pokazali su da postoji pozitivna korelacija (povezanost) ispitivanih genotipova rs2285666 i rs879922 gena *ACE2* sa ispitivanim skupinama (KOPB vs. ZDRAVI).
2. Analize razine ekspresije *ACE2* i korelacije s genotipom nisu bile provedive obzirom na nisku razinu ekspresije *ACE2* u PBMCs.
3. Rezultati analize povezanosti pokazali su da postoji pozitivna korelacija genotipa rs879922 s koncentracijom proupalnih citokina IL - 1 β , IL – 6, IL – 8 i TNF α .
4. Rezultati analiza povezanosti pokazali su da postoji pozitivna korelacija testiranih genotipova s općim upalnim biljezima - neutrofili i CRP.
5. Rezultati analiza povezanosti nisu pokazali korelaciju testiranih genotipova s vrijednosti FEV1, no jesu u vrijednostima FVC-a.
6. Rezultati analiza povezanosti nisu pokazali korelaciju testiranih genotipova s preživljenjem bolesnika s KOPB-om.

7. LITERATURA

1. U.S. National Library of Medicine. PubMed Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>. Pristupljeno 15. siječnja 2025.. 2025.
2. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87(5):1–10.
3. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(43):33238–43.
4. Schönfelder K, Breuckmann K, Elsner C, Dittmer U, Fistera D, Herbstreit F, et al. Transmembrane serine protease 2 Polymorphisms and Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2 Infection: A German Case-Control Study. *Front Genet*. 2021 Apr 21;12.
5. Wikimedia Commons. Human chromosome X ideogram. Wikimedia Commons. 2020. Dostupno na: https://bs.m.wikipedia.org/wiki/Datoteka:Human_chromosome_X_ideogram.svg. Pristupljeno 22. veljače 2025.
6. Lumpuy-Castillo J, Vales-Villamarín C, Mahillo-Fernández I, Pérez-Nadador I, Soriano-Guillén L, Lorenzo O, et al. Association of ACE2 Polymorphisms and Derived Haplotypes With Obesity and Hyperlipidemia in Female Spanish Adolescents. *Front Cardiovasc Med*. 2022 May 2;9.
7. Towler P, Staker B, Prasad SG, Menon S, Tang J, Parsons T, et al. ACE2 X-Ray Structures Reveal a Large Hinge-bending Motion Important for Inhibitor Binding and Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Apr 23;279(17):17996–8007.
8. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003 Nov 27;426(6965):450–4.
9. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science (1979)*. 2020 Mar 27;367(6485):1444–8.
10. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (1979)*. 2020 Mar 13;367(6483):1260–3.
11. Kuba K, Imai Y, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Trilogy of ACE2: A peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. Vol. 128, *Pharmacology and Therapeutics*. 2010. p. 119–28.
12. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 2005;436(7047):112–6.
13. Lambert DW, Yarski M, Warner FJ, Thornhill P, Parkin ET, Smith AI, et al. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the

- severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *Journal of Biological Chemistry*. 2005 Aug 26;280(34):30113–9.
14. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology*. 2004 Jun;203(2):631–7.
 15. Imai Y, Kuba K, Ohto-Nakanishi T, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis. *Circulation Journal*. 2010;74(3):405–10.
 16. Peti-Peterdi J, Harris RC. Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. Vol. 21, *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology; 2010. p. 1093–6.
 17. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiol Rev*. 2018 Jan 1;98(1):505–53.
 18. Marčetić D, Samaržija M, Dugac AV, Knežević J. Angiotensin-converting enzyme 2 (Ace2) as a potential diagnostic and prognostic biomarker for chronic inflammatory lung diseases. Vol. 12, *Genes*. MDPI; 2021 Jul.
 19. Santos RAS, Simoes E Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, De Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas [Internet]. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1432869100
 20. Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Díez-Freire C, Dooies A, et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(8):1065–72.
 21. Nehme A, Zouein FA, Zayeri ZD, Zibara K. An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2019;6(2):14.
 22. Celli B, Fabbri L, Criner G, Martinez FJ, Mannino D, Vogelmeier C, et al. Definition and Nomenclature of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Time for Its Revision. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022 Dec 1;206(11):1317–25.
 23. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the Prevention, Diagnosis and Management of COPD: 2025 Report. Pristupljeno 5. siječanj 2025. Dostupno na <https://goldcopd.org/2025-gold-reporst/>. 2025.
 24. Adeloye D, Song P, Zhu Y, Campbell H, Sheikh A, Rudan I. Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Respir Med*. 2022 May 1;10(5):447–58.
 25. Naghavi M, Wang H, Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015 Jan 10;385(9963):117–71.
 26. Halpin DMG, Celli BR, Criner GJ, Frith P, López Varela M V., Salvi S, et al. The GOLD Summit on chronic obstructive pulmonary disease in low- And middle-income countries. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2019 Nov 1;23(11):1131–41.

27. Meghji J, Mortimer K, Agusti A, Allwood BW, Asher I, Bateman ED, et al. Improving lung health in low-income and middle-income countries: from challenges to solutions. Vol. 397, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2021. p. 928–40.
28. World Health Organization. Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Geneva: World Health Organization; 2007. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/global-surveillance-prevention-and-control-of-chronic-respiratory-diseases>. Pristupljeno 15. ožujka 2025. . 2007.
29. Agustí A, Melén E, DeMeo DL, Breyer-Kohansal R, Faner R. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: understanding the contributions of gene–environment interactions across the lifespan. Vol. 10, *The Lancet Respiratory Medicine*. Elsevier Ltd; 2022. p. 512–24.
30. Terzikhan N, Verhamme KMC, Hofman A, Stricker BH, Brusselle GG, Lahousse L. Prevalence and incidence of COPD in smokers and non-smokers: the Rotterdam Study. *Eur J Epidemiol*. 2016 Aug 1;31(8):785–92.
31. Korytina GF, Akhmadishina LZ, Aznabaeva YG, Kochetova O V., Zagidullin NS, Kzhyshkowska JG, et al. Associations of the NRF2/KEAP1 pathway and antioxidant defense gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. *Gene*. 2019 Apr 15;692:102–12.
32. Agustí A, Noell G, Brugada J, Faner R. Lung function in early adulthood and health in later life: a transgenerational cohort analysis. *Lancet Respir Med*. 2017 Dec 1;5(12):935–45.
33. Thomsen M, Nordestgaard BG, Vestbo J, Lange P. Characteristics and outcomes of chronic obstructive pulmonary disease in never smokers in Denmark: A prospective population study. *Lancet Respir Med*. 2013 Sep;1(7):543–50.
34. Xie M, Liu X, Cao X, Guo M, Li X. Trends in prevalence and incidence of chronic respiratory diseases from 1990 to 2017. *Respir Res*. 2020 Feb 11;21(1).
35. Varmaghani M, Dehghani M, Heidari E, Sharifi F, Moghaddam SS, Farzadfar F. Global prevalence of chronic obstructive pulmonary disease: Systematic review and meta-analysis. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2019;25(1):47–57.
36. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Dec 3;1.
37. Agusti AGN. COPD, a multicomponent disease: Implications for management. *Respir Med*. 2005;99(6):670–82.
38. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. Nacionalni program za prevenciju raka pluća. Pristupljeno 4. veljače 2025. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr/UserDocsImages/2018%20Vijesti/NACIONALNI%20PROGRAM%20-%20RAK%20PLUĆA.doc>. 2020.
39. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. Vol. 195, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society; 2017. p. 557–82.

40. American Thoracic Society. Surveillance for respiratory hazards in the occupational settings. *Am Rev Respir Dis*. 1982 Nov;126(5):952–6.
41. Mahler DA, Wells CK. Evaluation of clinical methods for rating dyspnea. *Chest*. 1988;93(3):580–6.
42. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *European Respiratory Journal*. 2009 Sep;34(3):648–54.
43. Manian P. Chronic obstructive pulmonary disease classification, phenotypes and risk assessment. Vol. 11, *Journal of Thoracic Disease*. AME Publishing Company; 2019. p. S1761–6.
44. Jones PW, Tabberer M, Chen WH. Creating scenarios of the impact of copd and their relationship to copd assessment test (CAT™) scores. *BMC Pulm Med*. 2011 Aug 11;11.
45. Rogliani P, Calzetta L, Braido F, Cazzola M, Clini E, Pelaia G, et al. LABA/LAMA fixed-dose combinations in patients with COPD: A systematic review. Vol. 13, *International Journal of COPD*. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 3115–30.
46. Bafadhel M, Peterson S, De Blas MA, Calverley PM, Rennard SI, Richter K, et al. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *Lancet Respir Med*. 2018 Feb 1;6(2):117–26.
47. Lipson DA, Barnhart F, Brealey N, Brooks J, Criner GJ, Day NC, et al. Once-Daily Single-Inhaler Triple versus Dual Therapy in Patients with COPD. *New England Journal of Medicine*. 2018 May 3;378(18):1671–80.
48. Papi A, Vestbo J, Fabbri L, Corradi M, Prunier H, Cohuet G, et al. Extrafine inhaled triple therapy versus dual bronchodilator therapy in chronic obstructive pulmonary disease (TRIBUTE): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *The Lancet*. 2018 Mar 17;391(10125):1076–84.
49. Rabe KF, Martinez FJ, Ferguson GT, Wang C, Singh D, Wedzicha JA, et al. Triple Inhaled Therapy at Two Glucocorticoid Doses in Moderate-to-Very-Severe COPD. *New England Journal of Medicine*. 2020 Jul 2;383(1):35–48.
50. Singh D, Agusti A, Martinez FJ, Papi A, Pavord ID, Wedzicha JA, et al. Blood Eosinophils and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease Science Committee 2022 Review. Vol. 206, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society; 2022. p. 17–24.
51. Jose A. Mepolizumab for eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. Vol. 25, *Journal of Clinical Outcomes Management*. Turner White Communications Inc.; 2018.
52. Criner GJ, Celli BR, Brightling CE, Agusti A, Papi A, Singh D, et al. Benralizumab for the Prevention of COPD Exacerbations. *New England Journal of Medicine*. 2019 Sep 12;381(11):1023–34.
53. Bhatt SP, Rabe KF, Hanania NA, Vogelmeier CF, Cole J, Bafadhel M, et al. Dupilumab for COPD with Type 2 Inflammation Indicated by Eosinophil Counts. *New England Journal of Medicine*. 2023 Jul 20;389(3):205–14.

54. Wedzicha JA, Seemungal TAR. COPD exacerbations: defining their cause and prevention [Internet]. Vol. 370, *www.thelancet.com*. 2007. Available from: *www.thelancet.com*
55. Halpin DMG, Decramer M, Celli BR, Mueller A, Metzdorf N, Tashkin DP. Effect of a single exacerbation on decline in lung function in COPD. *Respir Med*. 2017 Jul 1;128:85–91.
56. Sundh J, Janson C, Lisspers K, Ställberg B, Montgomery S. The Dyspnoea, Obstruction, Smoking, Exacerbation (DOSE) index is predictive of mortality in COPD. *Primary Care Respiratory Journal*. 2012 Sep;21(3):295–301.
57. Donaldson GC, Hurst JR, Smith CJ, Hubbard RB, Wedzicha JA. Increased risk of myocardial infarction and stroke following exacerbation of COPD. *Chest*. 2010 May 1;137(5):1091–7.
58. Bhowmik A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. Vol. 55, *Thorax*. 2000.
59. Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. Vol. 17, *Eur Respir J*. 2001.
60. Ho TW, Tsai YJ, Ruan SY, Huang CT, Lai F, Yu CJ. In-hospital and one-year mortality and their predictors in patients hospitalized for first-ever chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: A nationwide population-based study. *PLoS One*. 2014 Dec 9;9(12).
61. Suissa S, Dell'Aniello S, Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: Severe exacerbations and mortality. *Thorax*. 2012;67(11):957–63.
62. Vanfleteren LEGW, Spruit MA, Groenen M, Gaffron S, Van Empel VPM, Bruijnzeel PLB, et al. Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Apr 1;187(7):728–35.
63. Ställberg B, Janson C, Johansson G, Larsson K, Stratelis G, Telg G, et al. Management, morbidity and mortality of COPD during an 11-year period: An observational retrospective epidemiological register study in Sweden (PATHOS). *Primary Care Respiratory Journal*. 2014;23(1):38–45.
64. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD: Where do we stand? Vol. 2013, *Mediators of Inflammation*. 2013.
65. Han MLK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: The future of COPD. Vol. 182, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2010. p. 598–604.
66. Izquierdo-Alonso JL, Rodriguez-González-moro JM, De Lucas-Ramos P, Unzueta I, Ribera X, Antón E, et al. Prevalence and characteristics of three clinical phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Respir Med*. 2013 May;107(5):724–31.
67. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Dec 3;1.

68. Sá-Sousa A, Rodrigues C, Jácome C, Cardoso J, Fortuna I, Guimarães M, et al. Cardiovascular Risk in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review. Vol. 13, *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
69. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. Vol. 131, *Clinical Science*. Portland Press Ltd; 2017. p. 1541–58.
70. Decramer M, Janssens W. Chronic obstructive pulmonary disease and comorbidities. Vol. 1, *The Lancet Respiratory Medicine*. 2013. p. 73–83.
71. Agustí A, Hogg JC. Update on the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*. 2019 Sep 26;381(13):1248–56.
72. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. Vol. 20, *Annual Review of Immunology*. 2002. p. 197–216.
73. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal Supplement*. 2001;34:50–9.
74. Bradford E, Jacobson S, Varasteh J, Comellas AP, Woodruff P, O’Neal W, et al. The value of blood cytokines and chemokines in assessing COPD. *Respir Res*. 2017 Oct 24;18(1):180.
75. Bailey KL, Goraya J, Rennard SL. The role of systemic inflammation in COPD. In: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Co-Morbidities and Systemic Consequences*. Humana Press Inc.; 2012. p. 15–30.
76. Hlapcic I, Belamaric D, Bosnar M, Kifer D, Dugac AV, Rumora L. Combination of systemic inflammatory biomarkers in assessment of chronic obstructive pulmonary disease: Diagnostic performance and identification of networks and clusters. *Diagnostics*. 2020 Dec 1;10(12).
77. Osei ET, Brandsma CA, Timens W, Heijink IH, Hackett TL. Current perspectives on the role of interleukin-1 signalling in the pathogenesis of asthma and COPD. Vol. 55, *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2020.
78. Borthwick LA. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. Vol. 38, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2016. p. 517–34.
79. Rumora L, Hlapčić I, Popović-Grle S, Rako I, Rogić D, Čepelak I. Uric acid and uric acid to creatinine ratio in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease: Potential biomarkers in multicomponent models comprising IL-1beta. *PLoS One*. 2020 Jun 1;15(6).
80. Karadag F, Karul AB, Cildag O, Yilmaz M, Ozcan H. Biomarkers of systemic inflammation in stable and exacerbation phases of COPD. *Lung*. 2008 Dec;186(6):403–9.
81. El-Shimy WS, El-Dib AS, Nagy HM, Sabry W. A study of IL-6, IL-8, and TNF- α as inflammatory markers in COPD patients. *Egyptian Journal of Bronchology*. 2014 Dec;8(2):91–9.
82. Wei J, Xiong XF, Lin YH, Zheng BX, Cheng DY. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. Vol. 2015, *PeerJ*. PeerJ Inc.; 2015.
83. Aghasafari P, George U, Pidaparti R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. Vol. 68, *Inflammation Research*. Birkhauser Verlag AG; 2019. p. 59–74.

84. Cao Y, Gong W, Zhang H, Liu B, Li B, Wu X, et al. A Comparison of Serum and Sputum Inflammatory Mediator Profiles in Patients with Asthma and COPD [Internet]. Vol. 40, The Journal of International Medical Research. 2012. Available from: <http://www.ginasthma.org/>
85. Garcia KC. Dual Arms of Adaptive Immunity: Division of Labor and Collaboration between B and T Cells. Vol. 179, Cell. Cell Press; 2019. p. 3–7.
86. Barnes PJ. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Vol. 11, Antioxidants. MDPI; 2022.
87. Sin DD, Paul 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 Mar 25;107(11):1514–9.
88. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med*. 2004;1:075–83.
89. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar Inflammation and its Relation to Emphysema in Smokers. Vol. 152, Am J Respir Crit Care Med. 1995.
90. Singh D, Wedzicha JA, Siddiqui S, De La Hoz A, Xue W, Magnussen H, et al. Blood eosinophils as a biomarker of future COPD exacerbation risk: Pooled data from 11 clinical trials. *Respir Res*. 2020 Sep 17;21(1).
91. Karadag F, Kirdar S, Karul AB, Ceylan E. The value of C-reactive protein as a marker of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Intern Med*. 2008 Mar;19(2):104–8.
92. Duvoix A, Dickens J, Haq I, Mannino D, Miller B, Tal-Singer R, et al. Blood fibrinogen as a biomarker of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2013 Jul;68(7):670–6.
93. Barnes PJ. New Concepts in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Vol. 54, Annual Review of Medicine. 2003. p. 113–29.
94. Pesci A, Majori M, Cuomo A, Borciani N, Bertacco S, Cacciani G, et al. Neutrophils infiltrating bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 1998 Jun;92(6):863–70.
95. Stanescu D, Sanna A, Veniter C, Kostianev S, Calcagni PG, Fabbri LM, et al. Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils [Internet]. Vol. 51, Thorax. 1996. Available from: <http://thorax.bmj.com/>
96. Sevenoaks MJ, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation and co-morbidity - A common inflammatory phenotype? Vol. 7, Respiratory Research. 2006.
97. Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: A systematic review and a meta-analysis. Vol. 59, Thorax. 2004. p. 574–80.
98. Decramer M, Rennard S, Troosters T, Mapel DW, Giardino N, Mannino D, et al. COPD as a lung disease with systemic consequences - Clinical impact, mechanisms, and potential for early intervention. Vol. 5, COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2008. p. 235–56.

99. Marshall R. The Pulmonary Renin-Angiotensin System. *Curr Pharm Des.* 2003 Apr 1;9(9):715–22.
100. Tan WSD, Liao W, Zhou S, Mei D, Wong WSF. Targeting the renin–angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. Vol. 40, *Current Opinion in Pharmacology.* Elsevier Ltd; 2018. p. 9–17.
101. Oakes JM, Fuchs RM, Gardner JD, Lazartigues E, Yue X. Nicotine and the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2018;315(5):R895–906.
102. Vasileiadis IE, Goudis CA, Giannakopoulou PT, Liu T. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers: A Promising Medication for Chronic Obstructive Pulmonary Disease? Vol. 15, *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 148–56.
103. Vilstrup F, Heerfordt CK, Kamstrup P, Hedsund C, Biering-Sørensen T, Sørensen R, et al. Renin-angiotensin-system inhibitors and the risk of exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide registry study. *BMJ Open Respir Res.* 2023 Mar 7;10(1).
104. Mancini GBJ, Etminan M, Zhang B, Levesque LE, FitzGerald JM, Brophy JM. Reduction of Morbidity and Mortality by Statins, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, and Angiotensin Receptor Blockers in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Jun 20;47(12):2554–60.
105. Mortensen EM, Copeland LA, Pugh MJV, Restrepo MI, de Molina RM, Nakashima B, et al. Impact of statins and ACE inhibitors on mortality after COPD exacerbations. *Respir Res.* 2009 Jun 3;10.
106. Paulin P, Maritano Furcada J, Ungaro CM, Bendelman G, Waisman GD, Castro HM, et al. Effect of angiotensin 2 receptor blockers on chronic obstructive lung disease mortality: A retrospective cohort study. *Pulm Pharmacol Ther.* 2017 Jun 1;44:78–82.
107. Saravi B, Li Z, Lang CN, Schmid B, Lang FK, Grad S, et al. The tissue renin-angiotensin system and its role in the pathogenesis of major human diseases: Quo Vadis? Vol. 10, *Cells.* MDPI; 2021. p. 1–23.
108. Ly H, Huang J, Miao M, Huang C, Hang W, Xu Y. Could patients with chronic obstructive pulmonary disease benefit from renin angiotensin system inhibitors? A meta-Analysis. *BMJ Open Respir Res.* 2023 Feb 24;10(1).
109. Kaparianos A, Argyropoulou E. Local Renin-Angiotensin II Systems, Angiotensin-Converting Enzyme and its Homo-logue ACE2: Their Potential Role in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmo-nary Diseases, Pulmonary Hypertension and Acute Respiratory Distress Syndrome. Vol. 18, *Current Medicinal Chemistry.* 2011.
110. Zhou WC, Qu J, Xie SY, Sun Y, Yao HW. Mitochondrial Dysfunction in Chronic Respiratory Diseases: Implications for the Pathogenesis and Potential Therapeutics. Vol. 2021, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Hindawi Limited; 2021.
111. Antunes MA, Lopes-Pacheco M, Rocco PRM. Oxidative Stress-Derived Mitochondrial Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Concise Review. Vol. 2021, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Hindawi Limited; 2021.

112. Catarata MJ, Ribeiro R, Oliveira MJ, Cordeiro CR, Medeiros R. Renin-angiotensin system in lung tumor and microenvironment interactions. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG; 2020. p. 1–24.
113. Adcock IM, Caramori G, Barnes PJ. Chronic Obstructive pulmonary disease and lung cancer: New molecular insights. *Respiration*. 2011 Mar;81(4):265–84.
114. Keller A, Fehlmann T, Ludwig N, Kahraman M, Laufer T, Backes C, et al. Genome-wide MicroRNA Expression Profiles in COPD: Early Predictors for Cancer Development. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2018 Jun 1;16(3):162–71.
115. De Torres JP, Marín JM, Casanova C, Cote C, Carrizo S, Cordoba-Lanus E, et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Oct 15;184(8):913–9.
116. Chao J, Wood JG, Blanco VG, Gonzalez NC. The systemic inflammation of alveolar hypoxia is initiated by alveolar macrophage-borne mediator(s). *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(5):573–82.
117. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* [Internet]. 2018;98:1627–738. Available from: www.prv.org
118. Hamming I, Cooper ME, Haegmans BL, Hooper NM, Korstanje R, Osterhaus ADME, et al. The emerging role of ACE2 in physiology and disease. Vol. 212, *Journal of Pathology*. 2007. p. 1–11.
119. Xue T, Wei N, Xin Z, Qingyu X. Angiotensin-converting enzyme-2 overexpression attenuates inflammation in rat model of chronic obstructive pulmonary disease. *Inhal Toxicol*. 2014;26(1):14–22.
120. Jia H. Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Inflammatory Lung Disease. *Shock*. 2016;46(3):239–48.
121. Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. Vol. 32, *Hypertension Research*. 2009. p. 533–6.
122. Robson Augusto Souza Santos X, Oliveira Sampaio W, Alzamora AC, Daisy Motta-Santos X, Natalia Alenina X, Bader M, et al. THE ACE2/ANGIOTENSIN-(1-7)/MAS AXIS OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM: FOCUS ON ANGIOTENSIN-(1-7). *Physiol Rev* [Internet]. 2018;98:505–53. Available from: www.prv.org
123. Oakes JM, Fuchs RM, Gardner JD, Lazartigues E, Yue X. Nicotine and the renin-angiotensin system. Vol. 315, *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. American Physiological Society; 2018. p. R895–906.
124. Aloufi N, Traboulsi H, Ding J, Fonseca GJ, Nair P, Huang SK, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 expression in COPD and IPF fibroblasts: The forgotten cell in COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2021;320(1):L152–7.
125. Simões E Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. Vol. 169, *British Journal of Pharmacology*. 2013. p. 477–92.

126. Du Y, Zhang H, Xu Y, Ding Y, Chen X, Mei Z, et al. Association among genetic polymorphisms of GSTP1, HO-1, and SOD-3 and chronic obstructive pulmonary disease susceptibility. *International Journal of COPD*. 2019;14:2081–8.
127. Li YY. Lack of association of ACE2 G8790A gene mutation with essential hypertension in the Chinese Population: A meta-analysis involving 5260 subjects. *Front Physiol*. 2012;3 SEP.
128. Yang M, Zhao J, Xing L, Shi L. The association between angiotensin-converting enzyme 2 polymorphisms and essential hypertension risk: A meta-analysis involving 14,122 patients. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2015 Dec 1;16(4):1240–4.
129. Polderman TJC, Benyamin B, De Leeuw CA, Sullivan PF, Van Bochoven A, Visscher PM, et al. Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. *Nat Genet*. 2015 Jun 26;47(7):702–9.
130. Väli Ü, Einarsson A, Waits L, Ellegren H. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Mol Ecol*. 2008 Sep;17(17):3808–17.
131. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. Vol. 56, *Annual Review of Medicine*. 2005. p. 303–20.
132. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*. 1998;8(12):1229–31.
133. Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends in Genetics*. 2000 May;16(5):198–200.
134. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang H, et al. The International HapMap Project. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):789–96.
135. Lu N, Yang Y, Wang Y, Liu Y, Fu G, Chen D, et al. ACE2 gene polymorphism and essential hypertension: An updated meta-analysis involving 11,051 subjects. *Mol Biol Rep*. 2012 Jun;39(6):6581–9.
136. van der Merwe L, Cloete R, Revera M, Heradien M, Goosen A, Corfield VA, et al. Genetic variation in angiotensin-converting enzyme 2 gene is associated with extent of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Genet*. 2008 Aug;124(1):57–61.
137. Wang SX, Tao T, Fu ZQ, Xie XZ, Wang H, Wang YT. Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme 2 gene confer a risk to lone atrial fibrillation in Chinese male patients. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(24):4608–11.
138. Cho MH, Hobbs BD, Silverman EK. Genetics of chronic obstructive pulmonary disease: understanding the pathobiology and heterogeneity of a complex disorder. Vol. 10, *The Lancet Respiratory Medicine*. Elsevier Ltd; 2022. p. 485–96.
139. Silverman EK, Sandhaus RA. clinical practice Alpha 1-Antitrypsin Deficiency. Vol. 360, *N Engl J Med*. 2009.
140. Strange C. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Associated COPD. Vol. 41, *Clinics in Chest Medicine*. W.B. Saunders; 2020. p. 339–45.

141. Ayres JG, Clark T, Ayres J. Abnormalities of the lungs and thoracic cage in the Ehlers-Danlos syndrome. Vol. 40, *Thorax*. 1985.
142. Stanley SE, Merck SJ, Armanios M. Telomerase and the genetics of emphysema susceptibility: Implications for pathogenesis paradigms and patient care. In: *Annals of the American Thoracic Society*. American Thoracic Society; 2016. p. S447–51.
143. Ingebrigtsen T, Thomsen SF, Vestbo J, Van Der Sluis S, Kyvik KO, Silverman EK, et al. Genetic influences on chronic obstructive pulmonary disease - A twin study. *Respir Med*. 2010 Dec;104(12):1890–5.
144. Pantazopoulos I, Magounaki K, Kotsiou O, Rouka E, Perlikos F, Kakavas S, et al. Incorporating Biomarkers in COPD Management: The Research Keeps Going. Vol. 12, *Journal of Personalized Medicine*. MDPI; 2022.
145. de Marco R, Accordini S, Antonicelli L, Bellia V, Bettin MD, Bombieri C, et al. The Gene-Environment Interactions in Respiratory Diseases (GEIRD) Project. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;152(3):255–63.
146. Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome [Internet]. 2004. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401422101
147. Beane J, Sebastiani P, Liu G, Brody JS, Lenburg ME, Spira A. Reversible and permanent effects of tobacco smoke exposure on airway epithelial gene expression. *Genome Biol*. 2007 Sep 25;8(9).
148. Steiling K, Kadar AY, Bergerat A, Flanigan J, Sridhar S, Shah V, et al. Comparison of proteomic and transcriptomic profiles in the bronchial airway epithelium of current and never smokers. *PLoS One*. 2009 Apr 9;4(4).
149. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, et al. MMP12, Lung Function, and COPD in High-Risk Populations. *New England Journal of Medicine*. 2009 Dec 31;361(27):2599–608.
150. Gilowska I, Majorczyk E, Kasper L, Bogacz K, Szczegielniak J, Kasper M, et al. The role of MMP-12 gene polymorphism - 82 A-to-G (rs2276109) in immunopathology of COPD in polish patients: A case control study. *BMC Med Genet*. 2019 Jan 18;20(1).
151. Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, Marcante KD, et al. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):45–52.
152. Wilk JB, Chen TH, Gottlieb DJ, Walter RE, Nagle MW, Brandler BJ, et al. A genome-wide association study of pulmonary function measures in the framingham heart study. *PLoS Genet*. 2009 Mar;5(3).
153. Castaldi PJ, Cho MH, Estépar RSJ, McDonald MLN, Laird N, Beaty TH, et al. Genome-wide association identifies regulatory loci associated with distinct local histogram emphysema patterns. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Aug 15;190(4):399–409.
154. Jones JT, Qian X, van der Velden JLJ, Chia SB, McMillan DH, Flemer S, et al. Glutathione S-transferase pi modulates NF- κ B activation and pro-inflammatory responses in lung epithelial cells. *Redox Biol*. 2016 Aug 1;8:375–82.
155. Morel F, Aninat C. The glutathione transferase kappa family. Vol. 43, *Drug Metabolism Reviews*. 2011. p. 281–91.

156. Ragland MF, Benway CJ, Lutz SM, Bowler RP, Hecker J, Hokanson JE, et al. Genetic advances in chronic obstructive pulmonary disease insights from COPDGene. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019 Sep 15;200(6):677–90.
157. Patel SK, Juno JA, Lee WS, Wragg KM, Hogarth PM, Kent SJ, et al. Plasma ACE2 activity is persistently elevated following SARS-CoV-2 infection: Implications for COVID-19 pathogenesis and consequences. Vol. 57, *European Respiratory Journal*. European Respiratory Society; 2021.
158. Liu Z, Xiao X, Wei X, Li J, Yang J, Tan H, et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2020 Jun 1;92(6):595–601.
159. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci*. 2020 Mar 1;63(3):364–74.
160. Leisman DE, Deutschman CS, Legrand M. Facing COVID-19 in the ICU: vascular dysfunction, thrombosis, and dysregulated inflammation. *Intensive Care Med*. 2020 Jun 1;46(6):1105–8.
161. Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, Chaudhuri A. Angiotensin II and inflammation: The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. Vol. 21, *Journal of Human Hypertension*. 2007. p. 20–7.
162. Wiese OJ, Allwood BW, Zemlin AE. COVID-19 and the renin-angiotensin system (RAS): A spark that sets the forest alight? *Med Hypotheses*. 2020 Nov 1;144.
163. Gintoni I, Adamopoulou M, Yapijakis C. The Impact of ACE and ACE2 Gene Polymorphisms in Pulmonary Diseases including COVID-19. Vol. 36, *In Vivo*. International Institute of Anticancer Research; 2022. p. 13–29.
164. Liu D, Chen Y, Zhang P, Zhong J, Jin L, Zhang C, et al. Association between circulating levels of ACE2-Ang-(1-7)-MAS axis and ACE2 gene polymorphisms in hypertensive patients. Vol. 95, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016.
165. Akcilar R, Kocak FE, Kar F, Isiklar OO, Atlanoglu S, Genc O, et al. Evaluation of the relationship between ACE2 G8790A and AT2R A1675G gene polymorphisms in COVID-19 patients with and without lung involvement. *Asian Biomedicine*. 2024 Aug 1;18(4):157–70.
166. Jones R, Davis A, Stanley B, Julious S, Ryan D, Jackson DJ, et al. Risk Predictors and Symptom Features of Long COVID Within a Broad Primary Care Patient Population Including Both Tested and Untested Patients. *Pragmat Obs Res*. 2021 Aug;Volume 12:93–104.
167. Munblit D, Bobkova P, Spiridonova E, Shikhaleva A, Gamirova A, Blyuss O, et al. Incidence and risk factors for persistent symptoms in adults previously hospitalized for COVID-19. *Clinical and Experimental Allergy*. 2021 Sep 1;51(9):1107–20.
168. Halpin DMG, Rabe AP, Loke WJ, Grieve S, Daniele P, Hwang S, et al. Epidemiology, Healthcare Resource Utilization, and Mortality of Asthma and COPD in COVID-19: A Systematic Literature Review and Meta-Analyses. *J Asthma Allergy*. 2022;15:811–25.

169. Busquets X, Macfarlane NG, Heine-Suñer D, Morlá M, Torres-Juan L, Iglesias A, et al. Angiotensin-converting-enzyme gene polymorphisms, smoking and chronic obstructive pulmonary disease. Vol. 2007, International Journal of COPD. 2007.
170. Kirtipal N, Thakur H, Sobti RC. Insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme and chronic obstructive pulmonary disease: A case-control study on north Indian population. *Mol Biol Res Commun*. 2019;8(4):167–70.
171. Simsek S, Tekes S, Oral D, Turkyilmaz A, Isik B, Isik MR, et al. The insertion/deletion polymorphism in the ACE gene and chronic obstructive pulmonary disease. *Genetics and Molecular Research*. 2013 Apr 25;12(2):1392–8.
172. Kang SW, Kim SK, Chung JH, Jung HJ, Kim K Il, Kim J, et al. Genetic Polymorphism of Angiotensin-Converting Enzyme and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Risk: An Updated Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
173. Xu G, Fan G, Sun Y, Yu L, Wu S, Niu W. Association of angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2018 Apr 1;19(2).
174. Marushchak M, Maksiv K, Krynytska I. ACE gene I/D polymorphism and arterial hypertension in patients with COPD. *Pneumologia*. 2019 Dec 1;68(3):114–9.
175. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine . 2025 [cited 2025 Feb 22]. NCBI: National Center for Biotechnology Information. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
176. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006 Aug 1;22(15):1928–9.
177. MedCalc Software Ltd. MedCalc Statistical Software. Dostupno na: <https://www.medcalc.org>. Pristupljeno 15. siječnja 2025. . 2022.
178. IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY ; 2015.
179. Terzikhan N, Verhamme KMC, Hofman A, Stricker BH, Brusselle GG, Lahousse L. Prevalence and incidence of COPD in smokers and non-smokers: the Rotterdam Study. *Eur J Epidemiol*. 2016 Aug 1;31(8):785–92.
180. Wheaton AG, Liu Y, Croft JB, Vanfrank B, Croxton TL, Punturieri A, et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Smoking Status-United States, 2017 [Internet]. 2017. Available from: https://www.cdc.gov/mmwr/cme/conted_info.html#weekly.
181. Aryal S, Diaz-Guzman E, Mannino DM. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. Vol. 9, International Journal of COPD. Dove Medical Press Ltd.; 2014. p. 1145–54.
182. Sørheim IC, Johannessen A, Gulsvik A, Bakke PS, Silverman EK, DeMeo DL. Gender differences in COPD: Are women more susceptible to smoking effects than men? *Thorax*. 2010;65(6):480–5.
183. Perez TA, Castillo EG, Ancochea J, Pastor Sanz MT, Almagro P, Martínez-Camblor P, et al. Sex differences between women and men with COPD: A new analysis of the 3CIA study. *Respir Med*. 2020 Sep 1;171.

184. Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E, et al. COPD in never smokers: Results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest*. 2011;139(4):752–63.
185. Vangjeli C, Dicker P, Tregouet DA, Shields DC, Evans A, Stanton A V. A polymorphism in ACE2 is associated with a lower risk for fatal cardiovascular events in females: The MORGAM project. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2011 Dec;12(4):504–9.
186. Lu N, Yang Y, Wang Y, Liu Y, Fu G, Chen D, et al. ACE2 gene polymorphism and essential hypertension: An updated meta-analysis involving 11,051 subjects. *Mol Biol Rep*. 2012 Jun;39(6):6581–9.
187. Wu YH, Li JY, Wang C, Zhang LM, Qiao H. The ACE2 G8790A Polymorphism: Involvement in Type 2 Diabetes Mellitus Combined with Cerebral Stroke. *J Clin Lab Anal*. 2017 Mar 1;31(2).
188. Wu YH, Li JY, Wang C, Zhang LM, Qiao H. The ACE2 G8790A Polymorphism: Involvement in Type 2 Diabetes Mellitus Combined with Cerebral Stroke. *J Clin Lab Anal*. 2017 Mar 1;31(2).
189. Chaoxin J, Daili S, Yanxin H, Ruwei G, Chenlong W, Yaobin T. The influence of angiotensin-converting enzyme 2 gene polymorphisms on type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Oct;17(19):2654–9.
190. Castaldi PJ, Boueiz A, Yun J, Estepar RSJ, Ross JC, Washko G, et al. Machine Learning Characterization of COPD Subtypes: Insights From the COPD Gene Study. Vol. 157, *Chest*. Elsevier Inc.; 2020. p. 1147–57.
191. Bastolla U, Chambers P, Abia D, Garcia-Bermejo ML, Fresno M. Is Covid-19 Severity Associated With ACE2 Degradation? *Frontiers in Drug Discovery*. 2022 Jan 25;1.
192. Zhang X, Wang Y, Zheng Y, Yuan J, Tong J, Xu J, et al. Effect of ACE, ACE2 and CYP11B2 gene polymorphisms and noise on essential hypertension among steelworkers in China: a case–control study. *BMC Med Genomics*. 2022 Dec 1;15(1).
193. Yadav AK, Gu W, Zhang T, Xu X, Yu L. Current Perspectives on Biological Therapy for COPD. Vol. 20, *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Taylor and Francis Ltd.; 2023. p. 197–209.
194. Wilk JB, Chen TH, Gottlieb DJ, Walter RE, Nagle MW, Brandler BJ, et al. A genome-wide association study of pulmonary function measures in the framingham heart study. *PLoS Genet*. 2009 Mar;5(3).
195. Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, Marcianti KD, et al. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):45–52.
196. Repapi E, Sayers I, Wain L V., Burton PR, Johnson T, Obeidat M, et al. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet*. 2010 Jan;42(1):36–44.
197. Wain L V., Shrine N, Artigas MS, Erzurumluoglu AM, Noyvert B, Bossini-Castillo L, et al. Genome-wide association analyses for lung function and chronic obstructive pulmonary disease identify new loci and potential druggable targets. *Nat Genet*. 2017 Mar 1;49(3):416–25.

198. Artigas MS, Wain L V., Miller S, Kheirallah AK, Huffman JE, Ntalla I, et al. Sixteen new lung function signals identified through 1000 Genomes Project reference panel imputation. *Nat Commun.* 2015 Dec 4;6.
199. Wain L V., Shrine N, Miller S, Jackson VE, Ntalla I, Artigas MS, et al. Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): A genetic association study in UK Biobank. *Lancet Respir Med.* 2015 Oct 1;3(10):769–81.
200. Castaldi PJ, Cho MH, Litonjua AA, Bakke P, Gulsvik A, Lomas DA, et al. The association of genome-wide significant spirometric loci with chronic obstructive pulmonary disease susceptibility. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011 Dec 1;45(6):1147–53.
201. Lutz SM, Cho MH, Young K, Hersh CP, Castaldi PJ, McDonald ML, et al. A genome-wide association study identifies risk loci for spirometric measures among smokers of European and African ancestry. *BMC Genet.* 2015 Dec 3;16(1).
202. Parker MM, Foreman MG, Abel HJ, Mathias RA, Hetmanski JB, Crapo JD, et al. Admixture mapping identifies a quantitative trait locus associated with FEV1/FVC in the COPD Gene Study. *Genet Epidemiol.* 2014 Nov 1;38(7):652–9.
203. Hayden LP, Hobbs BD, Busch R, Cho MH, Liu M, Lopes-Ramos CM, et al. X chromosome associations with chronic obstructive pulmonary disease and related phenotypes: an X chromosome-wide association study. *Respir Res.* 2023 Dec 1;24(1).
204. Khalilzadeh F, Sakhaee F, Sotoodehnejadnematalahi F, Zamani MS, Ahmadi I, Anvari E, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 rs2285666 polymorphism and clinical parameters as the determinants of COVID-19 severity in Iranian population. *Int J Immunogenet.* 2022 Oct 1;49(5):325–32.
205. Möhlendick B, Schönfelder K, Breuckmann K, Elsner C, Babel N, Balfanz P, et al. ACE2 polymorphism and susceptibility for SARS-CoV-2 infection and severity of COVID-19. *Pharmacogenet Genomics.* 2021;165–71.
206. Srivastava A, Bandopadhyay A, Das D, Pandey RK, Singh V, Khanam N, et al. Genetic Association of ACE2 rs2285666 Polymorphism With COVID-19 Spatial Distribution in India. *Front Genet.* 2020 Sep 25;11.
207. Gómez J, Albaiceta GM, García-Clemente M, López-Larrea C, Amado-Rodríguez L, Lopez-Alonso I, et al. Angiotensin-converting enzymes (ACE, ACE2) gene variants and COVID-19 outcome. *Gene.* 2020 Dec 15;762.
208. Karakaş Çelik S, Çakmak Genç G, Pişkin N, Açıkgöz B, Altınsoy B, Kurucu İssiz B, et al. Polymorphisms of ACE (I/D) and ACE2 receptor gene (Rs2106809, Rs2285666) are not related to the clinical course of COVID-19: A case study. *J Med Virol.* 2021 Oct 1;93(10):5947–52.
209. Stolz D, Mkorombindo T, Schumann DM, Agusti A, Ash SY, Bafadhel M, et al. Towards the elimination of chronic obstructive pulmonary disease: a Lancet Commission. Vol. 400, *The Lancet.* Elsevier B.V.; 2022. p. 921–72.
210. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *European Respiratory Journal.* 2009 Sep;34(3):648–54.

8. SAŽETAK

Usprkos velikom napretku u smanjenju globalnog utjecaja nezaraznih bolesti uključujući kardiovaskularne, cerebrovaskularne bolesti i neoplazme, pojavnost i smrtnost od kronične opstruktivne bolesti pluća (KOPB) i dalje bilježi porast. KOPB je progresivna kronična upalna bolest obilježena ireverzibilnom opstrukcijom protoka zraka s kompleksnim interakcijama genetskih i okolišnih čimbenika. Unatoč prepoznatim vanjskim rizičnim čimbenicima poput pušenja i izloženosti štetnim česticama, bolest se razvija samo u manjem postotku izloženih osoba, što upućuje na ulogu genetske predispozicije. Angiotenzin-konvertirajući enzim 2 (ACE2) kodiran istoimenom genom, kao dio renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) povezan je s promjenom aktivnosti upalnih procesa u organizmu. Obzirom da je upala u osnovi patogeneze KOPB-a, željeli smo ispitati je li se prisutnost pojedinih polimorfizama smještenih u genu *ACE2* može povezati s mehanizmom nastanka i razvoja bolesti. Pretraživanjem baze podataka odabrali smo dva polimorfizma smještena unutar gena *ACE2*, rs2285666 i rs879922. Odabrani su funkcionalni jednonukleotidni polimorfizmi (SNP) koji su dovoljno zastupljeni u populaciji (MAF>1%), a obzirom na epigenetske faktore mogu utjecati na razinu ekspresije gena/proteina ili funkcionalnost proteina, odnosno nastanak i tijek bolesti. Obzirom na činjenicu da je regulacija aktivnosti gena/proteina *ACE2* povezana s promjenom aktivnosti upalnih procesa, a neregulirana upala ima značajnu ulogu u etiopatogenezi KOPB-a, željeli smo ispitati postoji li povezanost polimorfnih biljega smještenih u genu *ACE2* s nastankom i razvojem KOPB-a te ispitati njihov utjecaj na ekspresiju gena *ACE2*. Cilj ovoga istraživanja bio je doprinijeti boljem razumijevanju do sada neistražene uloge gena *ACE2* u molekularnim mehanizmima uključenima u razvoj i progresiju KOPB-a. Ispitana je distribucija i učestalost jednonukleotidnih polimorfizama rs2285666 i rs879922 u bolesnika s KOPB-om i zdravim ispitanicima te njihova povezanost s upalnim biomarkerima, plućnom funkcijom i kliničkim ishodima. Studija je obuhvatila pacijente s KOPB-om i zdravu kontrolnu skupinu. Molekularna analiza tj. genotipizacija rs2285666 i rs879922 je provedena metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) korištenjem TaqMan proba. Određivanje ekspresije gena *ACE2* provedeno je metodom reverzne transkripcije i PCR-a u stvarnom vremenu (RT-qPCR). Razina sistemske upale procijenjena je određivanjem koncentracije IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α uz pomoć protutijela metodom ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), a koncentracija upalnih biomarkera (neutrofila, C-reaktivnog proteina i fibrinogena) određivanjem standardnim analizatorima iz uzoraka periferne krvi. Klinički parametri uključivali su opće demografske podatke, pušački status, nalaze funkcionalne obrade pluća,

stadij bolesti po GOLD klasifikaciji i petogodišnje preživljenje. Istraživanjem je pronađena razlika u povezanosti oba polimorfizma s KOPB-om. Unutar polimorfizma rs2285666 značajno je učestalija heterozigotna alelna kombinacija CT u bolesnika s KOPB-om, usporedno sa skupinom zdravih ispitanika. Utvrđena je također statistički značajna razlika u učestalosti i razdiobi genotipova kako u dominantnom (CT-TT) tako i superdominantnom modelu (CT) doprinoseći riziku za KOPB od 1,06-5,5 puta ovisno o genetičkom modelu nasljeđivanja. Unutar polimorfizma rs879922 utvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti i razdiobi genotipa samo u superdominantnom (GC) genetičkom modelu. Nije bilo značajnih razlika u vrijednostima proupalnih citokina za polimorfizam rs2285666, dok su vrijednosti proupalnih citokina IL-1 β , IL-6, IL-8 i TNF- α pozitivno korelirale s polimorfizmom rs879922. Nađena je značajna razlika u vrijednostima neutrofila i CRP unutar polimorfizma rs2285666, a za polimorfizam rs879922 pozitivna korelacija pronađena je samo za vrijednost neutrofila. Unatoč razlikama u upalnim markerima nije pronađena značajna korelacija testiranih polimorfizama s FEV1 niti s preživljenjem pacijenata. Analize ekspresije ACE2 nisu bile provedive zbog niske razine ekspresije u analiziranim uzorcima. Ovo istraživanje potvrđuje povezanost polimorfizama rs2285666 i rs879922 s upalnim odgovorom u bolesnika s KOPB-om, osobito kroz korelaciju s proupalnim citokinima i sistemskim upalnim markerima. Ovi rezultati upućuju na mogući utjecaj genetskih varijacija ACE2 na upalne procese u KOPB-u, ali su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnio njihov precizni mehanizam djelovanja.

9. SUMMARY

The prevalence and mortality of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) still are on an increase in spite of considerable advancement in reducing the effects of noncommunicable diseases including cardiovascular and cerebrovascular diseases and neoplasms. COPD is a progressive chronic inflammatory disease characterised by irreversible air flow obstruction with complex interactions of genetic and environmental factors. Although external risk factors such as smoking and exposure to adverse particles have been recognized, the disease develops only in a low percentage of exposed individuals, suggesting a role of genetic predisposition. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) coded by the gene of the same name, as part of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), is associated with altered activity of inflammatory processes in the body. As inflammation underlies the pathogenesis of COPD, we investigated whether the presence of particular polymorphisms located in the *ACE2* gene could be associated with the mechanism of the COPD onset and development. On searching the database, we chose two polymorphisms located in the *ACE2* gene, rs2285666 and rs879922. We chose functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) which are sufficiently represented in the population (minor allele frequency /MAF/ >1%) and can, considering the epigenetic factors, influence the level of the gene/protein expression or protein functionality, i.e., the occurrence and course of the disease. Since regulation of the *ACE2* gene/protein activity is associated with altered inflammatory process activity, and unregulated inflammation has a prominent role in the pathogenesis of COPD, we aimed to assess the potential correlation of the polymorphic markers located in the *ACE2* gene with the onset and development of COPD, as well as their effect on the *ACE2* gene expression. The main aim of the study was to contribute to better understanding of the *ACE2* gene role in molecular mechanisms involved in the development and progression of COPD, which has not been investigated to date. Distribution and frequency of the rs2285666 and rs879922 SNPs were assessed in COPD patients and healthy subjects, as well as their association with inflammatory biomarkers, lung function, and clinical outcomes. The study included COPD patients and healthy control group. Molecular analysis, i.e., rs2285666 and rs879922 genotyping, was performed by the method of polymerase chain reaction (PCR) with the use of TaqMan probes. The *ACE2* gene expression was determined by the real-time reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) method. The level of systemic inflammation was assessed by determination of interleukin (IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) concentrations with antibodies using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The concentrations of inflammatory

biomarkers (neutrophils, C-reactive protein and fibrinogen) were determined from peripheral blood samples on standard analysers. Clinical parameters included general demographic data, smoking status, lung function test findings, disease stage according to GOLD classification, and five-year survival. Study results showed a difference in the association of both polymorphisms and COPD. Within the rs2285666 polymorphism, the heterozygous allele CT combination was significantly more common in COPD patients as compared with the healthy control group. A statistically significant difference was also recorded in genotype frequency and distribution both in the dominant (CT-TT) and super-dominant (CT) models, contributing to the risk of COPD 1.06-5.5 times, depending on the genetic model of inheritance. Within the rs879922 polymorphism, a statistically significant difference was found in genotype frequency and distribution only in the super-dominant (GC) genetic model. There were no significant differences in the levels of proinflammatory cytokines for the rs2285666 polymorphism, whereas the levels of the IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α cytokines yielded positive correlation with the rs879922 polymorphism. There was a significant difference in the neutrophil and CRP levels within the rs2285666 polymorphism, whereas in the rs879922 polymorphism positive correlation was only recorded for neutrophil level. Despite differences recorded in the levels of inflammatory markers, there was no significant correlation of the tested polymorphisms with forced expiratory volume (FEV1) or patient survival. Analysis of ACE2 expression could not be analysed due to the low level of expression in analytical samples. This study confirmed the association of rs2285666 and rs879922 polymorphisms with inflammatory response in COPD patients, especially through correlation with proinflammatory cytokines and systemic inflammatory markers. These results suggest the possible impact of ACE2 genetic variations on inflammatory processes in COPD. However, additional research is needed to elucidate their precise mechanism of action.

10. PRILOZI

Prilog 1. Modificirana Medical Research Council (mMRC) skala zaduhe (41)

mMRC	Simptomi
Stupanj 0	Nedostatak zraka nije prisutan (osim u ekstremnom opterećenju)
Stupanj 1	Nedostatak zraka pri penjanju uzbrdicom
Stupanj 2	Nedostatak zraka pri hodu po ravnom, sporiji od vršnjaka
Stupanj 3	Nedostatak zraka nakon manje od 100 m ili par minuta, radi čega moraju stati
Stupanj 4	Nedostatak zraka pri minimalnom naporu, npr. odijevanju, stoga ne mogu izlaziti iz kuće

Prilog 2. Test za procjenu KOPB (CAT, engl. *COPD Assessment Test*) (210) (44)

Za svaku tvrdnju navedenu ispod, označite (znakom X) kućicu koja Vas trenutno najbolje opisuje. Pazite da za svako pitanje odaberete samo jedan odgovor

CAT upitnik

Nikada ne kašljem	0 1 2 3 4 5	stalno kašljem
Uopće nemam sekreta(sluzi) u plućima	0 1 2 3 4 5	moja su pluća u cijelosti puna sekreta (sluzi)
Uopće ne osjećam stezanje u prsnom košu	0 1 2 3 4 5	Osjećam jako stezanje u prsnom košu
Kada se penjem uzbrdo ili po stepenicama ne nedostaje mi zraka	0 1 2 3 4 5	Kada se penjem uzbrdo ili po stepenicama jako mi nedostaje zraka
Nisam ograničen/ograničena u obavljanju bilo kojih kućanskih aktivnosti	0 1 2 3 4 5	Vrlo sam ograničen/ograničena u obavljanju kućanskih aktivnosti
S povjerenjem izlazim iz kuće bez obzira na svoju plućnu bolest	0 1 2 3 4 5	Uopće nemam povjerenja kad izlazim iz kuće zbog svoje plućne bolesti
Čvrsto spavam	0 1 2 3 4 5	Ne spavam čvrsto zbog svoje plućne bolesti
Imam puno energije	0 1 2 3 4 5	Uopće nemam energije

Rezultat se iskazuje kao zbroj bodova svih odgovora

11. ŽIVOTOPIS

Dejan Marčetić rođen je 22. travnja 1989. godine u Virovitici. Osnovnu školu završio je u Gradini a opću gimnaziju u Virovitici. Diplomirao je 2014. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Pripravnički staž odradio je u Općoj bolnici u Virovitici. Nakon položenog državnog ispita radi kao liječnik opće medicine u ambulanti u Gradini pri Domu zdravlja Virovitičko-podravske županije. Specijalizaciju iz pulmologije započinje 2015. godine u Općoj bolnici u Virovitici uz specijalističko usavršavanje u KB Dubrava i KBC Zagreb – Klinici za plućne bolesti Jordanovac. Tijekom specijalizacije završio je i Poslijediplomski specijalistički studij Pulmologija. Specijalistički ispit položio je 2021. godine te od tada radi kao odjelni liječnik u Odjelu za opću internu medicinu i pulmologiju Opće bolnice Virovitica gdje je na položaju voditelja. Naknadno je obranio završni specijalistički rad i stekao titulu sveučilišnog specijaliste pulmologije (univ.spec.med.). Aktivni je član pulmoloških liječničkih društava, te aktivno sudjeluje u stručnim i znanstvenim aktivnostima.

POPIS PUBLIKACIJA

1. **Marčetić D**, Samaržija M, Vukić Dugac A, Knežević J (2021) Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) as a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Chronic Inflammatory Lung Diseases. *Genes (Basel)*. 12: 1-12.
2. **Marčetić Dejan**, Liović Tatjana, Štajduhar Anamarija, Lampalo Marina, Popović-Grle Sanja Anti IL-5 therapy in the treatment of severe acute asthma available at a secondary hospital facility – experience of the Virovitica General Hospital // 5th Forum of Southeast European Countries on Severe Asthma Šibenik, Hrvatska, 2023. str. xx-xx (poster, podatak o recenziji nije dostupan, sažetak, stručni)
3. **Marčetić D.**, Trkeš V., Boras Z., Hećimović A., Koprivanac A., Vukić Dugac A. Milijarna tuberkuloza pluća ili post COVID – pitanje je sad! Prikaz bolesnice sa ulceroznim kolitisom i milijarnom tbc pluća. *Toraks 2021.*, Zagreb, str. P-01 (poster, sažetak, stručni)
4. **Marčetić D.**, Čičak P., Knežević J., Popović-Grle S. Jesmo li mogli biti ažurniji u detekciji deficijencije alfa-1-antitripsina (AATD)? *Toraks 2021.*, Zagreb, str. P-02 (poster, sažetak, stručni)
5. Čičak P., **Marčetić D.**, Popović-Grle S. Neglected aspects of long-term oxygen therapy in severe COPD patients–case report. *Toraks 2020*, Zagreb, str. P-01 (poster, sažetak, stručni)
6. Rnjak D. , Štajduhar A. , Šatalić L.13, Ažić D., Bakale Brkić K., Batarilo Hađar M. , Čičak P., Folnožić I., Ilak D., Ivčević T., Kosanović Bajić M., Kotris I., Lalić K., Marković A., **Marčetić D.**, Meter J., Šegrt Ribičić I., Škopljanac I., Štefanac I., Tolić Biočina A., Verbanac I., Vukić Dugac A. Koji inhalacijski uređaj je najbolji? – odabrali specijalizanti. *Toraks 2020*, Zagreb, str. P-06 (poster, sažetak, stručni)
7. **Marčetić D.**, Markelić I., Muršić D., Boras Z., Trkeš V., Baričević D., Samaržija M., Pavliša G., Vukić Dugac A. Paraneoplastičku hipokalijemiju u bolesnika s karcinomom pluća zbrinjavali smo anestetikom etomidatom – prikaz slučaja. *Toraks 2020*, Zagreb, str. P-05 (poster, sažetak, stručni)
8. **Marčetić D.**, Čičak P., Madžarac G., Popović-Grle S. Zbrinjavanje sekundarnog pneumotoraksa u bolesnika s nedostatkom alfa-1-antitripsina – prikaz slučaja. *Toraks 2020*, Zagreb, str. P-04 (poster, sažetak, stručni)

9. **Marčetić D.**, Rodić L. Hemoptiza kao neobični znak disecirajuće aneurizme aorte. Toraks 2019, Zagreb, str. P-13. (prikaz slučaja, sažetak, stručni)

10. Rodić L., **Marčetić D.** (2019) Jedan od sto tisuća. Shock. God. XII, br. 1, str. 50-52

11. **Marčetić D.**, Nedić A., Borovčak Lovrenc A. (2018) Case Report: Hemoptysis as a presentation of aortic dissection. Biomedical Journal of Scientific and Technical Research Volume 11: 1-2 (članak, stručni)