

# Beta kemokini i metaloproteinaze u imunopatogenezi pneumonije uzrokovane mikoplazmom pneumonije

---

**Puljiz, Ivan**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2008**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:993509>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Puljiz**

**Beta kemokini i metaloproteinaze u  
imunopatogenezi pneumonije  
uzrokovane mikoplazmom  
pneumonije**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2008.**



Klinički dio istraživanja proveden je u Klinici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” Zagreb, a laboratorijski dio u Znanstvenoj jedinici Klinike za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” Zagreb.

Rad je financiran iz sredstava znanstvenih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH:

1. Pneumonije: dijagnostički i terapijski algoritmi (broj projekta: 108180, glavni istraživač prof. dr. sc. Ilija Kuzman)
2. Imunoreakcije na hantaviruse i leptospire (broj projekta: 143-1430115-0103, glavni istraživač prof. dr. sc. Alemka Markotić)
3. Imunoreakcije pri infekcijama unutarstaničnim patogenima (broj projekta: 0021005, glavni istraživač prof. dr. sc. Alemka Markotić)
4. Centar za emergentne i re-emergentne zarazne bolesti (broj projekta J-29/07, glavni istraživač prof. dr. sc. Alemka Markotić)
1. Istraživanje etiologije i patogeneze pneumonija (broj projekta: 108-0000000-3491, glavni istraživač prof. dr. sc. Ilija Kuzman)

Mentor rada je prof. dr. sc. Ilija Kuzman

Doktorska disertacija sadrži:           94 stranice  
  8 slika  
  i 3 tablice.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se prof. dr. sc. I. Kuzmanu na stručnoj pomoći i podršci tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. A. Markotić na uloženom trudu i vrijednim savjetima.

Veliku pomoć u pripremi i izvođenju laboratorijskih testova pružili su mi L. Cvetko-Krajinović, dipl. ing. biologije i Marija Gužvinec, dipl. ing. biologije, na čemu im se zahvaljujem.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji koja me pratila tijekom izrade ovog rada.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. MYCOPLASMA PNEUMONIAE</b>	<b>1</b>
1.1.1. Uvodni dio	1
1.1.2. Klasifikacija	2
1.1.3. Imunopatogeneza	4
1.1.4. Epidemiologija	8
1.1.5. Klinički oblici bolesti	10
1.1.6. Patologija	12
1.1.7. Mikrobiološka dijagnostika	13
1.1.8. Liječenje	15
1.1.9. Sprječavanje	16
<b>1.2. KEMOKINI</b>	<b>17</b>
1.2.1. Uvodni dio	17
1.2.2. Interleukin-8	21
1.2.3. Kemotaksijski protein monocita-1 (MCP-1)	23
1.2.4. Upalni protein makrofaga-1 $\beta$ (MIP-1 $\beta$ )	24
<b>1.3. MATRIKS METALOPROTEINAZE</b>	<b>26</b>
1.3.1. Uvodni dio	26
1.3.2. Matriks metaloproteinaze-2 i -9 (MMP-2 i MMP-9)	29
<b>1.4. ULOGA KEMOKINA I METALOPROTEINAZA U IMUNOPATOGENEZI PNEUMONIJA</b>	<b>30</b>
1.4.1. Istraživanja in vitro i in vivo	31
1.4.2. Istraživanja na životinjskim modelima	32
1.4.3. Klinička istraživanja u čovjeka	34
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	<b>36</b>
<b>3. BOLESNICI I METODE</b>	<b>38</b>
<b>3.1. Bolesnici</b>	<b>38</b>
<b>3.2. Metode</b>	<b>40</b>
3.2.1. Serološko dijagnosticiranje pneumonija uzrokovanih mikoplazmom pneumonije	40
3.2.2. Izolacija mononuklearnih stanica	41
3.2.3. Izolacija ribonukleinske kiseline	42
3.2.4. Određivanje genske ekspresije kemokina i matriks metaloptroteinaza kvantitativnim “real-time” PCR-om	43
3.2.5. „Protein array“ test	44
3.2.6. Određivanje kemokina i matriks metaloproteinaza imunoenzimskim testom	45
<b>3.3. Statistička obrada</b>	<b>46</b>

<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>47</b>
<b>4.1.</b>	<b>Epidemiološke i kliničke osobitosti bolesnika</b>	<b>48</b>
<b>4.2.</b>	<b>Analiza ekspresije gena i serumske razine IL-8, MCP-1, MIP-1<math>\beta</math>, MMP-2 i MMP-9</b>	<b>49</b>
<b>4.3.</b>	<b>Korelacija imunoloških parametara, laboratorijskih nalaza i težine bolesti</b>	<b>57</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>SAŽETAK</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>75</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b>	<b>92</b>

## POPIS KRATICA

AMV RT - vrsta reverzne transkriptaze (od engl. *avian myeloblastosis virus*)  
ALT – alanin aminotransferaza  
ARDS – adultni respiratorni distress sindrom  
AST – aspartat aminotransferaza  
BAL – bronhoalveolarni lavat  
BALB/c – soj pokusnih miša  
C- gama kemokini  
CC – beta kemokini  
CCR - kemokinski (C-C motiv) receptor (od engl. *chemokine (C-C motif) receptor*)  
*C. pneumoniae* – *Chlamydomytila pneumoniae*  
CRP – C-reaktivni protein  
CXC – alfa kemokini  
CXCR - kemokinski (C-X-C motiv) receptor (od engl. *chemokine (C-X-C motif) receptor*)  
CX3C – delta kemokini  
C57BL/6 – soj pokusnih miša  
C3H/HeJ – soj pokusnih miša  
c-DNA - komplementarna DNK (od engl. *complementary DNA*)  
DNK - deoksiribonukleinska kiselina  
dsRNA - dvolancana RNK (od engl. *double-stranded RNA*)  
mRNA - glasnička RNK (od engl. *messenger RNA*)  
ECM - izvanstanični matriks (od engl. *extracellular matrix*)  
ELISA - enzimski imunotest (od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)  
ENA-78 – kemokin (od engl. *epithelial-cell derived neutrophil attractant-78*)  
GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (od engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)  
GCP – kemokin ( od engl. *granulocyte chemotactic protein*)  
ICAM - medustanična adhezijska molekula (od engl. *intercellular adhesion molecule*)  
IFA - neizravna imunofluorescencija (od engl. *indirect fluorescent antibody*)  
Ig - imunoglobulin  
IL - interleukin  
IL-R - receptor za interleukin  
INF - interferon  
IP-10 - interferonom-inducibilni protein 10 (od engl. *interferon-inducible protein 10*)  
IPF – idiopatska plućna fibroza  
KKS – kompletna krvna slika  
KOPB – kronična opstruktivna plućna boleat  
LPS – lipopolisaharidi  
MCP – kemokacijski protein monocita (od engl. *monocyte chemotactic protein*)  
MHC - glavni sklop antigena tkivne podudarnosti (od engl. *major histocompatibility complex*)  
MIP - upalni protein makrofa (od engl. *macrophage inflammatory protein*)  
MMP - matriks metaloproteinaza (od engl. *matrix metalloproteinase*)  
*M. pneumoniae* – *Mycoplasma pneumoniae*  
NK (stanice) - prirodno ubilačke stanice (od engl. *natural killer*)  
PCR - lančana reakcija polimeraze (od engl. *polymerase chain reaction*)  
RANTES - kemokin RANTES (od engl. *regulated upon activation, normal T expressed and secreted*)  
RNK - ribonukleinska kiselina



iRNK - informacijska ribonukleinska kiselina  
RVK – reakcija vezanja komplementa  
YGT – gamaglutamil transferaza  
SE – sedimentacija eritrocita  
ssRNA - jednolančana RNK (od engl. *single-stranded RNA*)  
TIMP - tkivni inhibitor matriks metaloproteinaza (od engl. *tissue inhibitor of MMPs*)  
Th1/Th2 – pomoćnički T-limfociti (od engl. *T helper lymphocytes*)  
TNF - čimbenik tumorske nekroze (od engl. *tumor necrosis factor*)  
VCAM - adhezijska molekula vaskularnih stanica (od engl. *vascular cell adhesion molecule*)

# 1. U V O D

## 1.1. *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

### 1.1.1. Uvodni dio

Prvi podatak o infekciji mikoplazmom potječe iz 1898. godine, kada su Nocard i Roux izolirali uzročnika pleuropneumonije goveda, danas poznatog pod nazivom *Mycoplasma mycoides*.<sup>1</sup> Prema prvom izoliranom uzročniku stvorena je skupina Pleuropneumonia like organisms (PPLO). Oni su slijedećih nekoliko desetljeća povezivani s različitim bolestima u životinja, a dovodilo ih je se u vezu s bolestima u čovjeka. Klieneberger je 1930. godine postavio koncept da su mikoplazme «L-forme» bakterija kojima nedostaje stanični zid, a koje žive u simbiozi s drugim bakterijama koje imaju stanični zid.<sup>2</sup> Ta teorija je podijelila istraživače na dvije suprotstavljene strane. Jedni su smatrali da su mikoplazme posebna vrsta, a drugi da su varijantama drugih bakterija koje su izgubile stanični zid. Kontroverze su postojale sve do 1960. godine kada se pokazalo da su mikoplazme jedinstvena životna forma koja pod nikakvim uvjetima nema sposobnost izgradnje staničnog zida.

Dienes i Edsall su 1937. godine prvi izolirali mikoplazmu u žene koja je imala apsces Bartolinijeve žlijezde.<sup>3</sup> Radilo se o vrsti koja je poslije nazvana *Mycoplasma hominis*. Druge humane mikoplazme, kao što su *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma salivarium* i T-sojevi poslije poznati kao ureaplazma opisani su do polovice 20. stoljeća. Eaton i suradnici su 1944. godine prvi put izolirali *Mycoplasma pneumoniae* u kulturi iskašljaja bolesnika s primarnom atipičnom pneumonijom. Smatrali su da se radi o virusu, a uzročnik je po autoru nazvan Eatonov agens.<sup>4</sup> Narednih dvadesetak godina slijede testiranja na dobrovoljcima i brojna istraživanja koja su pokazala da Eatonov agens uzrokuje pneumoniju i bronhitis u čovjeka.<sup>5</sup> Smatran je virusom sve dok nije dokazano da su antibiotici učinkoviti protiv infekcije uzrokovane Eatonovim agensom. Marmion i Goodburn su u svom istraživanju posumnjali da Eatonov agens nije virus, nego PPLO.<sup>6</sup> Konačni dokaz da je Eatonov agens mikoplazma dali su Chanock i suradnici 1962. godine. Oni su uspješno kultivirali taj agens na umjetnoj podlozi za PPLO obogaćenju nativnim bjelančevinama i ekstraktom kvasca.<sup>7</sup> Prema prijedlogu Chanocka i suradnika od 1963. godine Eatonov agens nozi naziv *Mycoplasma pneumoniae*.<sup>8</sup>

### 1.1.2. Klasifikacija

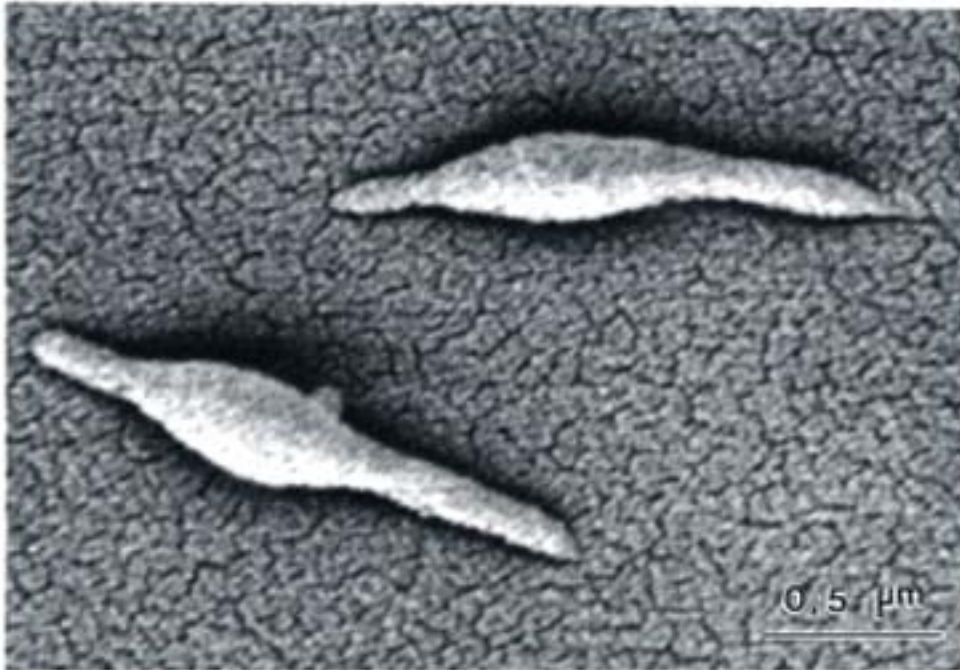
Riječ *mycoplasma* potječe od grčkih riječi «mykes» = gljivica i «plasma» = oblikovan, a zamijenio je stari izraz PPLO iz pedesetih godina 20. stoljeća.<sup>9</sup> Izraz se nije promijenio do današnjeg dana, a asocirao je na *Mycoplasma fungoides* čiji rast podsjeća na gljivice. Početkom šesdesetih godina prošlog stoljeća mikoplazme su označene kao članovi razreda nazvanog *Mollicutes* (lat. «mollis» = mekan, «cutis» = koža). Aktualna taksonomija u razred *Mollicutes* uključuje 4 reda, 5 porodica, 8 rodova i oko 200 poznatih vrsta koje su otkrivene u čovjeka i životinja. *M. pneumoniae* pripada porodici *Mycoplasmataceae* i redu *Mycoplasmatales*.<sup>10</sup> Taksonomija razreda *Mollicutes* je revidirana na osnovu analize 16S rRNK.<sup>11</sup> Analiza sekvenci 16S rRNK sugerira da je mikoplazma u uskoj vezi s gram-pozitivnim eubakterijama koje uključuju bacile, streptokoke i laktobacile.

Mikoplazme su najmanji poznati organizmi koji su sposobni egzistirati izvan stanice. *M. pneumoniae* ima oblik vretena dužine 1 do 2 µm i širine 0,1 do 0,2 µm pa se ne može otkriti svjetlosnim mikroskopom i ne proizvodi vidljivu zamućenost u tekućem mediju (slika 1). Tipične kolonije rijetko prelaze veličinu od 100 µm promjera kada se kultiviraju na obogaćenim hranilištima, kao što je SP4 agar.

Otkrivena je kompletna sekvenca genoma *M. pneumoniae* 1996. godine, a sastoji se od 816.394 parova baza.<sup>12</sup> Ograničena sposobnost biosinteze kao i veličina genoma su odgovorni za mnoge biološke karakteristike mikoplazma. Mikoplazme nisu u stanju sintetizirati peptidoglikanski stanični zid budući da u genomu ne posjeduju gene odgovorne za te procese. Mikoplazme nisu nikad otkrivene u prirodi kao samostalno živeći mikroorganizmi jer ovise o stanicama domaćina koje ih opskrbljuju tvarima neophodnim za njihovo parazitiranje. Osim toga mikoplazme trebaju sterole sa rast na umjetnim podlogama koji su prisutni u serumu. Steroli su sastavna komponenta troslojne mikoplazmatske membrane koja pruža strukturnu potporu osmotski labilnoj mikoplazmi. Održavanje osmotske stabilnosti je važno budući da mikoplazme nemaju čvrstu staničnu stijenku.

U usporedbi s drugim bakterijama mikoplazme posjeduju ograničeni metabolizam i sposobnost sinteze proteina, ugljikohidrata i lipida. Kao rezultat adaptacije na parazitiranje koje podrazumijeva prianjanje na stanicu domaćina *M. pneumoniae* je razvila specijalizirani reproduktivni ciklus. Ona se množi binarnom fisijom tako da se stvara

duplikatura na mjestu organele kojom se priljubi na stanicu, a poslije duplikatura seli na suprotni pol tokom replikacije, a prije podjele nukleotida.<sup>13</sup>



Slika 1. *Mycoplasma pneumoniae*

Prema: Balish MF, Krause DC. Cytadherence and the cytoskeleton. U: Razin S, Herrmann R (ur.). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002:491-518.<sup>13</sup>

### 1.1.3. Imunopatogeneza

Mikoplazme su primarno patogeni sluznica, poglavito respiratornog i urogenitalnog trakta koje parazitiraju u uskoj vezi s epitelnim stanicama njihovog domaćina. *M. pneumoniae* isključivi je parazit čovjeka, dok se neke druge humane mikoplazme povremeno mogu izolirati u životinja.

Prvi i najvažniji korak u patogenezi jest adherencija *M. pneumoniae* na površinske stanice respiratornog epitela.<sup>14</sup> Na taj način *M. pneumoniae* je zaštićena od mukocilijarnog transportnog sustava domaćina što joj omogućuje da proizvodi različite lokalne citotoksične efekte. Ona je primarno izvanstanični mikroorganizam čije preživljavanje ovisi o stanici domaćina. Zbog toga je razvila kompleksne i specijalizirane organele za prijanjanje koje joj olakšavaju parazitiranje. Organela se sastoji od specijalizirane šiljaste strukture sa središnjom gušćom jezgrom u obliku štapa. Oko toga je prostor koji je omotan proširenjem stanične membrane mikoplazme. Šiljasta struktura sadrži mrežu adhezina i pomoćnih adhezijskih proteina koji pokreću i koncentriraju adhezine. Još se točno ne zna što povezuje stanicu domaćina i adhezine mikoplazme, iako su uključeni sijalična kiselina i sulfatni glukolipidi.<sup>15,16</sup> Novija istraživanja su otkrila ekspresiju dva proteina na površini stanice *M. pneumoniae*, faktor elongacije TU i piruvat dehidrogenaza E1- $\beta$  koji se vežu za fibronektin stanice domaćina.<sup>17</sup>

Površinski adhezin, identificiran kao P-1, je protein molekulske težine 170 kD koji je koncentriran na vršku organele i predstavlja glavnu strukturu odgovornu za interakciju *M. pneumoniae* i stanice domaćina.<sup>18</sup> Pored toga, manje koncentracije P-1 proteina otkrivene su na cijeloj površini stanice. Istraživanja na životinjskim modelima dokazala su da monoklonska protutijela protiv P-1 proteina blokiraju adherenciju *M. pneumoniae*, a protutijela protiv nekih drugih proteina nemaju učinak na adherenciju.<sup>19</sup> Krause i sur. su otkrili da nije dovoljna ekspresija samo P-1 proteina za adherenciju na neke stanice domaćina, nego da su potrebni i drugi proteini.<sup>20</sup> Isto tako potvrđeno je da je P-30 jedan od pomoćnih proteina koji su uključeni u adherenciju *M. pneumoniae*.<sup>21</sup> Pored P-30 proteina otkriveni su i drugi proteini unutar *M. pneumoniae* koji su uključeni u adherenciju, kao što su HMW-1, HMW-2, HMW-3, HMW-4, HMW-5, P-90 i P-65.<sup>13</sup>

Mikoplazme su primarno patogeni sluznica, a prebivaju na epitelnoj površini izvan stanice. Novija istraživanja su otkrila da se neke vrste mikoplazma, kao što su *M. penetrans* i *M. fermentans* spajaju i ulaze u stanicu domaćina.<sup>22</sup> Također, dokazano je da *M. pneumoniae*

preživljava, sintetizira DNK i replicira se u uvjetima umjetnih staničnih kultura dulje od šest mjeseci.<sup>23</sup> Unutarstanično prebivanje *M. pneumoniae* olakšalo bi nastanak latentne ili kronične infekcije koja zaobilazi imunološke mehanizme domaćina i koju je teško lijekovima eradicirati. Spajanje stanične membrane mikoplazme i stanice domaćina dovodi do oslobađanja različitih hidrolitičkih enzima mikoplazme koji utječu na indukciju i ekspresiju citokina. Do sada nije poznata granica do koje *M. pneumoniae* ulazi i replicira se intracelularno *in vivo*. Stoga treba potvrditi kliničko značenje ovih teoretskih postavki povezanih s spajanjem stanice.

Adherencija *M. pneumoniae* na respiratorni trakt je početni i najvažniji događaj u nastanku bolesti. No, još uvijek se točno ne zna na koji način *M. pneumoniae* oštećuje epitelne stanice dišnog sustava nakon adherencije. Bliska povezanost mikoplazme olakšana adhezivima i stanice domaćina važna je za lokalizirano oštećenje tkiva i citotoksičnost. Za razliku od mnogih drugih humanih patogena, *M. pneumoniae* ne proizvodi nikakav egzotoksin. Isto tako, zbog malog genoma ne posjeduje enzime koji su povezani s virulencijom, kao što su npr. katalaze. *M. pneumoniae* proizvodi vodikov peroksid i kisikove radikale koji zajedno s endogenim toksičnim molekulama kisika stanice domaćina induciraju oksidativni stres u respiratornom epitelu.<sup>23</sup>

Kompleksna mreža interakcija između mikoplazme i imunološkog sustava domaćina podrazumijeva specifične i nespecifične imunološke reakcije koje inducira mikoplazma. Kako mikoplazme nemaju stanični zid, niti lipopolisaharide (LPS), njihovi lipoproteini posjeduju upalne aktivnosti. U *M. pneumoniae* otkriveni su geni za više od 30 različitih lipoproteina.<sup>24</sup> Specifična imunološka obrana domaćina uključuje produkciju sistemskih i lokalnih protutijela različitih klasa i stimulaciju staničnog imunološkog sustava. Ciljno mjesto većine protutijela koje proizvodi domaćin u obrani od mikoplazmatske infekcije jest P1 protein. Potvrđeno je da mikoplazma uzrokuje pojačanu produkciju ne samo IgM i IgG, nego i IgA i IgE klase imunoglobulina.<sup>25</sup> Osim humoralne, u obrani domaćina od mikoplazmatske infekcije sudjeluje i specifična T-stanična imunost. Hayashi i sur. su istraživali klonove limfocita u perifernoj krvi i bronhoalveolarnom lavatu (BAL-u) bolesnika s mikoplazmatskom pneumonijom.<sup>26</sup> Broj CD4 T-limfocita, kao i odnos CD4/CD8 T-limfociti bio je smanjen u perifernoj krvi, dok se registrira veći broj aktiviranih T-limfocita i odnos CD4/CD8 u BAL-u.

Pored specifičnih, mikoplazma posjeduje široke nespecifične imunomodulatorne učinke koji utječu na imunološki sustav i pridonosi njenim patogenim svojstvima. Tako nakon adherencije mikoplazme na epitelne stanice dišnog sustava ona može izazvati supresiju ili

poliklonsku stimulaciju B i T-limfocita, indukciju citokina, povećati citotoksičnost makrofaga, prirođenoubilačkih stanica (NK) stanica i T-limfocita, pojačati ekspresiju staničnih receptora i aktivirati sustav komplementa.<sup>27</sup> Stimulacija imunoloških stanica mikoplazmom karakterizirana je oslobađanjem različitih topljivih medijatora koji igraju glavnu ulogu u ishodu interakcije između mikoplazme i tih stanica. Aktivirani fagociti izlučuju različite vrste molekula kao što su, enzimi, prostaglandini, toksični kisikovi radikali i peroksidaze, dušični oksid, proupalni citokini i kemokini.<sup>27</sup> Svi ti medijatori imaju značajan lokalni i sistemski učinak.

Citokini i kemokini su grupa malenih signalnih molekula koje izlučuju aktivirani limfociti, makrofagi i neke druge stanice. Oni su vitalna komponenta i humoralnog i staničnog imunološkog odgovora i vezanjem na specifične receptore na ciljnim stanicama pokazuju svoja biološka svojstva. Mogu započeti i pojačati upalni i drugi imunološki odgovor privlačenjem i aktiviranjem stanica, reguliranjem aktivacije i diferencijacije T-limfocita u staničnoj imunosti, te započinjanjem i reguliranjem lokalnih procesa reparacije koji su ključni za smirivanje lokalne upale.<sup>28</sup> Citokini i kemokini su značajni medijatori u obrani pluća od infekcije, ali treba imati na umu da se njihov pozitivan ili negativan učinak na domaćina teško može predvidjeti zbog lokalne kompleksnosti unutar stanica i tkiva. *M. pneumoniae* je sposobna inducirati mnoge citokine, što je potvrđeno u brojnim istraživanjima, a to dovodi do zaključka da oni mogu jednim dijelom biti odgovorni za patogenezu infekcije u različitim oblicima bolesti.

*In vitro* istraživanja su potvrdila da je citadherencija mikoplazme značajna za indukciju nekih citokina, a epitelne stanice dišnog sustava su kao dio lokalnog staničnog odgovora na infekciju mikoplazmom važan izvor citokina. Jones i sur. su u miševa istraživali imunopatogenezu infekcije *M. pulmonis*, koja je prirodni patogen dišnog sustava glodavaca.<sup>29</sup> Otkrili su da su T-limfociti glavna populacija limfocita koja uzrokuje plućne infiltrate u miševa inficiranim s *M. pulmonis* s dominacijom CD4 T-limfocita i u plućima i u limfnim čvorovima donjeg dijela dišnog sustava, dok je broj CD8 T-limfocita u plućima tek blago povišen. U limfnim čvorovima donjeg dijela dišnog sustava limfociti produciraju interleukin-4 (IL-4) koji favorizira Th-2 (od engl. T-helper) imunološki odgovor. S druge strane, u slezeni je pojačana produkcija interferona-gama (IFN- $\gamma$ ) što upućuje na dominaciju Th-1 imunološkog odgovora. Taj podatak pokazuje da regionalne razlike u imunološkom odgovoru na infekciju mikoplazmom mogu imati učinak na domaćina. Faulkner i sur. su registrirali različitu koncentraciju citokina i kemokina u BAL-u i serumu

miševa inficiranih mikoplazmom što upućuje da treba razlikovati lokalni od sistemskog citokinskog/kemokinskog odgovora domaćina.<sup>30</sup>

Uloga citokina, kemokina i drugih medijatora u patogenezi *M. pneumoniae* pneumonije u čovjeka je od velikog interesa tokom zadnjih desetak godina. Neka klinička kao i eksperimentalna istraživanja fokusirala su se na citokine kao čimbenike odgovorne za mehanizme oštećenja stanica tijekom mikoplazmatske infekcije ili kao markere težine bolesti. Brojna istraživanja u tom pravcu su potvrdila da mikoplazma u čovjeka može inducirati različite citokine i kemokine. Mnogi od tih medijatora upale imaju povišenu razinu u alveolarnoj tekućini i u serumu. Međutim, siguran podatak da su neki citokini i kemokini odgovorni za neke kliničke slike infekcije uzrokovane *M. pneumoniae* ne postoji zbog kompleksne mreže citokina i kemokina i vjerojatno činjenice da citokini i kemokini ne igraju središnju ulogu u razvoju bolesti.

Zaključno, značajan napredak u poznavanju kompleksne mreže citokina, kemokina i njihovih brojnih regulatornih učinaka na imunološki i upalni odgovor domaćina rezultira novim spoznajama o ulozi mikoplazme u indukciji širokog asortimana medijatora upale. Veliki broj dosadašnjih istraživanja ukazuje da citokini i kemokini koje izlučuje veliki broj različitih stanica tokom *M. pneumoniae* infekcije igraju važnu ulogu u imunopatogenezi bolesti. Različiti tipovi stanica u različitim modelima odgovaraju indukcijom različitih profila citokina i kemokina. Osim toga, količina i priroda citokina i kemokina, njihova ciljna stanica, priroda aktivirajućeg signala, vrijeme i slijed njihovog djelovanja, kao i vrsta eksperimentalnog modela mogu imati učinka na rezultat specifičnog citokina/kemokina. Tako razlike u tipovima stanica i animalnim modelima mogu dijelom objasniti razliku u profilu citokina/kemokina koji je induciran *M. pneumoniae*. U radu s ljudima, veće varijacije kao što su, dob, spol, prehrana, zdravstveno stanje, životni stil i faktori okoliša mogu utjecati na rezultate istraživanja.



#### 1.1.4. Epidemiologija

*M. pneumoniae* uzrokuje infekcije gornjeg i donjeg dijela dišnog sustava. Infekcije se pojavljuju u djece i odraslih, endemijski i epidemijski u cijelom svijetu. Prema istraživanju Foya i sur. Bila je odgovorna za 15 do 20% svih pneumonija iz opće populacije u razdoblju od 1962. do 1975. godine u Seattlu (SAD).<sup>31</sup> Iako ne pokazuje izrazit sezonski karakter, infekcije su najučestalije tokom ljeta u područjima umjerene klime.<sup>32</sup> To se pripisuje i manjoj incidenciji drugih respiratornih uzročnika u tom razdoblju. Epidemije se u pravilu pojavljuju krajem ljeta i početkom jeseni.<sup>33</sup> Duga inkubacija i relativno slaba transmisija odgovorni su za produženo razdoblje epidemija. U najnovije vrijeme, nakon identifikacije genoma, *M. pneumoniae* se dijeli na podtipove na osnovu razlika u P-1 proteinu. Nekoliko istraživača su analizom više od 200 izolata *M. pneumoniae* zaključili da je to jedinstven mikroorganizam koji se može klasificirati u dvije skupine ili dva podtipa na osnovu sekvenci gena P-1 proteina, ORF6 gena i P65 gena.<sup>34,35</sup> Dorigo-Zetsma i sur. kliničke izolate mikoplazme dijele u osam podtipova unutar dvije skupine genoma.<sup>36</sup> Istraživanja u Njemačkoj i Japanu pokazuju da se različiti podtipovi P-1 proteina mogu pojavljivati ciklički u epidemijama *M. pneumoniae*.<sup>37,38</sup>

Neke osobe mogu biti asimptomatske kliconoše mikoplazme i na taj način kao rezervoari biti izvor infekcije. Gnarpe i sur. su otkrili mikoplazmu u 13,5% od 758 zdravih dobrovoljaca.<sup>39</sup> U slijedećih 11 mjeseci incidencija mikoplazme se smanjila na 4,5% od 499 dostupnih dobrovoljaca što sugerira fluktuaciju kliconoštva tijekom vremena.

*M. pneumoniae* se prenosi aerosolom s čovjeka na čovjeka, a moguća je eksperimentalna infekcija inokulacijom aerosola.<sup>40</sup> U osoba s akutnom infekcijom mikoplazma se nalazi u nosu, ždrijelu, traheji i iskašljaju. Širenje i prijenos uzročnika znatno je olakšano kašljem. Za prijenos je potrebna velika količina kapljica, odnosno blizak kontakt s oboljelim. Stoga se može reći da *M. pneumoniae* nije visoko kontagiozna. Bolest se najčešće pojavljuje epidemijski u školama, dječjim ustanovama, vojarnama i sličnim zatvorenim populacijskim ustanovama.<sup>32,33</sup> Jedanput unešena infekcija u kolektiv širi se sporo, dugo traje i zahvaća većinu neimunih osoba. Nekoliko istraživanja govori o širokom rasponu inkubacijskog razdoblja, od 4 do 23 dana.<sup>41,42</sup> Stopa infekcije unutar obiteljskog kontakta iznosi oko 39%, a u većine inficiranih radi se o asimptomatskoj infekciji.<sup>41</sup>

Postoje brojni izvještaji o pojavi epidemija koje uzrokuje *M. pneumoniae* u zajednici ili u zatvorenim populacijskim skupinama, kao što su vojarne, škole, studentski domovi, te

brojne druge zatvorene ustanove.<sup>40,41</sup> Stopa infekcije za osoba koje žive u bliskom kontaktu, kao što su vojarne kreće se od 25 do 71%.<sup>41</sup>

Prema epidemiološkim istraživanjima utjecaj spola na infekciju *M. pneumoniae* je neznatan. *M. pneumoniae* je uzročnik više od 40% pneumonija u djece iz opće populacije, odnosno u oko 18% pneumonija koje zahtjevaju hospitalizaciju.<sup>32</sup> U starijim istraživanjima pneumonija uzrokovana mikoplazmom bila je rijetka u djece mlađe od 5 godina, najčešća u dobi od 5 do 15 godina, da bi incidencija padala nakon adolescentne i odrasle dobi.<sup>32,33,43</sup>

Međutim, mikoplazma se može pojaviti endemijski, a povremeno i epidemijski u starijih osoba, kao i u djece mlađe od 5 godina. Ursi i sur. su dokazali *M. pneumoniae* u aspiratu nazofarinksa novorođenčeta s kongenitalnom pneumonijom, što sugerira najvjerojatnije transplacentarni prijenos.<sup>44</sup>

Iako je pneumonija najteža klinička manifestacija koju izaziva *M. pneumoniae*, tipični klinički sindrom povezan s mikoplazmom, poglavito u djece je traheobronhitis. Obično je udružen s različitim simptomima gornjeg dišnog sustava.

Iako se većina pneumonija liječi ambulantno (stoga izraz «walking pneumonia»), *M. pneumoniae* je važan uzročnik i u hospitaliziranih bolesnika s pneumonijom. Marston i sur. su mikoplazmu otkrili u 5,4%, odnosno u 32,5% bolesnika s pneumonijom iz opće populacije u dvije regije u SAD-u.<sup>45</sup>

### 1.1.5. Klinički oblici bolesti

Prema istraživanju Feiza i sur. *M. pneumoniae* uzrokuje infekciju gornjih dišnih putova u oko 50% svih inficiranih bolesnika.<sup>46</sup> Bolest se u pravilu razvija postupno, danima i nerijetko traje više tjedana ili mjeseci. Klinički se najčešće manifestira grloboljom, promuklošću, hunjavicom, vrućicom, neproduktivnim kašljem, glavoboljom, zimicama, bolovima u mišićima, bolovima u uhu i općom slabošću.<sup>47,48</sup> U težim oblicima bolesti može se pojaviti nedostatak zraka, a kašalj sličiti onome u pertusisu, uzrokujući u bolesnika bolove u prsima. Upala grla s ili bez cervikalne limfadenopatije može biti uobičajena pojava, poglavito u djece, a ponekad se pojavljuju konjuktivitis i miringitis.<sup>49</sup> U djece mlađe od pet godina najčešće manifestacije bolesti jesu hunjavica i traheobronhitis koji se rijetko kompliciraju pneumonijom. S druge strane, u djece od 5 do 15 godina često se razvija pneumonija zbog koje je ponekad potrebna hospitalizacija.<sup>50</sup> Asimptomatska ili blaga bolest je osobito česta u odrasloj dobi, a pneumonija se razvija samo u 3 do 10% inficiranih osoba. U nekih bolesnika, poglavito starijih potrebna je hospitalizacija zbog pneumonije.<sup>51</sup>

Auskultacija pluća otkriva difuzne ili lokalizirane hropce u ekspiriju. Kako su alveole rijetko zahvaćene krepitacije su rijetke. U nekomplikiranim slučajevima vrućica traje oko tjedan dana, a kašalj i umor mogu trajati više od dva tjedna. Simptomi i znakovi bolesti kraće traju ako je na vrijeme započeta odgovarajuća antimikrobna terapija.<sup>43</sup> Međutim, nekoliko istraživanja pokazuju oštećenje respiratorne funkcije i tri godine nakon infekcije.<sup>52</sup>

Klinička prezentacija respiratorne infekcije uzrokovane *M. pneumoniae* često sličiti onima koje uzrokuju drugi respiratorni uzročnici, poglavito *Chlamydomytila pneumoniae* i respiratorni virusi. Isto tako, *M. pneumoniae* može biti prisutna u dišnom sustavu istodobno s drugim uzročnicima.<sup>53</sup> U nekim slučajevima infekcija prouzročena mikoplazmom može prethoditi i pojačavati druge bakterijske infekcije. Kao moguće objašnjenje za taj sinergizam navodi se imunosupresija ili promijenjena flora dišnog sustava u prisutnosti mikoplazme.<sup>54</sup> *M. pneumoniae* može uzrokovati fulminantnu pneumoniju u djece s funkcionalnom asplenijom i različitim vrstama imunosupresija.<sup>55</sup> Poznato je da djeca s hipogamaglobulinemijom imaju veći rizik za nastanak infekcija dišnog sustava i zglobova.<sup>56</sup> Opisana je infekcija uzrokovana *M. pneumoniae* u djece s AIDS-om.<sup>57</sup> Nije poznato u kojoj mjeri HIV utječe na incidenciju i težinu infekcija koje

uzrokuje *M. pneumoniae*. Osim toga, opisane su fulminantne infekcije sa smrtnim ishodom u prethodno zdravih ljudi, no one su na sreću vrlo rijetke.<sup>58</sup>

Hematološki ili biokemijski nalazi rijetko imaju dijagnostičko značenje u infekcijama koje uzrokuje *M. pneumoniae*. Leukociti su uglavnom u granici normalnih vrijednosti, a otprilike jedna trećina bolesnika s pneumonijom može imati blažu leukocitozu.<sup>49</sup> U 60 do 80% bolesnika nalazi se neutrofilija, bez značajnijeg udjela nezrelih oblika. Sedimentacija eritrocita umjereno je ubrzana u akutnoj fazi bolesti. Citološka analiza iskašljaja bojenog po Gramu otkriva mononuklearne ili polinuklearne stanice uz fiziološku bakterijsku floru. Rijetko se registriraju patološki nalazi aminotransferaza, ureje i kreatinina. Neki bolesnici razvijaju hemolitičku anemiju zbog prisutnosti hladnih aglutinina. Hladni aglutinini su IgM protutijela koja se registriraju u oko polovice bolesnika nakon mikoplazmatske infekcije i perzistiraju nekoliko tjedana.

Rendgenska slika, u pravilu, otkriva veći patološki nalaz nego što se očekuje na osnovu fizikalnog pregleda pluća. U pneumoniji se nalazi eksudacija mononuklearnih stanica u intersticiju. Radiološki se to manifestira nježnim difuznim i mrežolikim bronhopneumoničnim infiltratima oko hilusa ili u donjim režnjevima pluća. Uobičajeno je zahvaćeno jedno plućno krilo uz povećanje limfnih čvorova oko hilusa. Ponekad se registriraju bilateralna žarišta, te lobarni infiltrati.<sup>59</sup> Gotovo u 10%, poglavito starijih bolesnika s pneumonijom koji se hospitaliziraju potrebna je umjetna ventilacija.<sup>51</sup> Manji pleuralni izljevi otkrivaju se u oko 25% bolesnika.<sup>60</sup> Relapsi se mogu pojaviti u oko 10% bolesnika u drugom ili trećem tjednu bolesti, a otkrivaju se uglavnom rengenskim nalazom infiltrata u istom ili drugom plućnom režnju.

Više od 30 godina špekulira se o mogućoj ulozi *M. pneumoniae* u patogenezi astme. Glavno je pitanje je li mikoplazma primarni uzrok astme ili jedan od faktora u njenom razvoju. Točna uloga mikoplazme u patogenezi kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB) nije razjašnjena. U većini istraživanja osim mikoplazme dokazani su i brojni drugi respiratorni patogeni u bolesnika s egzacerbacijom KOPB.

Smatra se da se u otprilike četvrtine bolesnika s mikoplazmatskom infekcijom pojavljuju manifestacije izvan dišnog sustava. One se registriraju prije, za vrijeme ili nakon respiratornih simptoma, ali i u njihovu odsustvu. Većina tih komplikacija se pripisuje imunološkim mehanizmima, odnosno autoimunim reakcijama. S druge strane, ne može se zanemariti i uloga direktne invazije *M. pneumoniae* u patogenezi tih događanja. Naime, mikoplazma je izolirana iz krvi, sinovijalne tekućine, cerebrospinalnog likvora, perikardijalne tekućine i kožnih lezija.<sup>61-64</sup>

### **1.1.6. Patologija**

Patohistološka analiza pri infekciji mikoplazmom otkriva ulceracije i destrukciju cilijarnog epitela bronha i bronhiola. Isto tako, opisuju se edem velikih i malih dišnih putova, infiltrati bronhiola i alveola makrofazima, limfocitima, neutrofilima, plazma stanicama i fibrinom.<sup>65,66</sup> Uz to, registrira se hiperplazija pneumocita tipa II i difuzno oštećenje alveola. Pleuralni izljevi i oštećenje alveola obično se nalazi u težim slučajevima, a moguće su i sekvele, kao što su bronhiektazije i intersticijska plućna fibroza.<sup>67</sup> Rijetko se opisuju plućni apscesi.<sup>68</sup>

### 1.1.7. Mikrobiološka dijagnostika

U svakodnevnoj kliničkoj praksi ne postoji pouzdan specifičan i brz test za postavljanje etiološke dijagnoze *M. pneumoniae* infekcije u akutnoj fazi bolesti. Većina dijagnostičkih metoda koje se koriste imaju veće značenje za epidemiološka istraživanja nego za kliničara, zbog dugotrajnosti i kompliciranosti izvođenja. Laboratorijski testovi za potvrdu infekcije uključuju kultivaciju, serološke metode i lančanu reakciju polimeraze (PCR).

Mikoplazme za rast trebaju obogaćenu podlogu sa serumom, ekstraktom kvasca i metaboličkim supstratima. Na hranjivim podlogama rastu sporo, pa je za kultivaciju potrebno 7-21 dan. Uzorci za izdvajanje *M. pneumoniae* i PCR su ispirak ždrijela, iskašljaj i BAL, a prihvatljiv je i obrisak ždrijela. Osjetljivost kultivacije iznosi oko 90%, a specifičnost 50-90% zbog visoke razine nosilaštva u zdravoj populaciji.

U svakodnevnoj kliničkoj praksi za dijagnostiku *M. pneumoniae* najčešće se koriste serološki testovi, koji se danas smatraju «zlatnim standardom» prema kojemu se uspoređuju druge metode.<sup>69</sup> IgM protutijela pojavljuju se rano već na početku bolesti, dosežu najviši titar nakon 1-4 tjedna, a unutar nekoliko mjeseci dolazi do pada titra. Mogu perzistirati do godinu dana. IgG protutijela se stvaraju sporije od IgM protutijela, ali vrlo dugo perzistiraju. Značajan porast titra IgG protutijela u parnim uzorcima seruma upućuje na akutnu infekciju ili reinfekciju. U reinfekciji IgM protutijela ne moraju biti prisutna. IgA protutijela obično su pokazatelj akutnosti. U starijih bolesnika, u kojih je veća vjerojatnost reinfekcije, IgA protutijela se pojavljuju u višim titrovima. Za potvrdu infekcije treba testirati parne uzorke seruma uzete u razmaku od dva do četiri tjedna s dokazom serokonvezije ili najmanje dvostrukog porasta titra protutijela u imunoenzimskim testovima (ELISA), odnosno četverostrukog ili višeg porasta titra protutijela u reakciji vezanja komplementa (RVK).<sup>70</sup> Danas postoji više seroloških testova za dijagnostiku *M. pneumoniae*, a najčešće se koriste RVK, ELISA i test indirektno imunofluorescencije (IFA).

PCR se koristi kao alternativni dijagnostički postupak zbog brojnih ograničenja kultivacije i seroloških testova. Iako je metoda visoko osjetljiva i specifična još uvijek nije utvrđen optimalni uzorak, kao i interpretacija nalaza.<sup>71</sup> PCR-om se ne razlikuje aktivna infekcija od nosilaštva *M. pneumoniae*. Otkrivanje *M. pneumoniae* u respiratornom traktu nije nužno povezano s bolesti dišnog sustava, poglavito u imunokompetentnih osoba. Stoga je za

razlikovanje akutne od perzistentne infekcije, odnosno nosilaštva potrebno učiniti i serološko testiranje.

Zaključno, može se reći da je nedostatak brze, prihvatljive i sigurne mikrobiološke dijagnostike za *M. pneumoniae* značajan razlog da se velik broj infekcija etiološki ne dijagnosticira. Zbog zahtijevnih uvijeta rasta i dugotrajnosti postupka rijetki su laboratoriji koji kultiviraju *M. pneumoniae*. Molekularne metode nisu standardizirane i zahtjevaju kritičku evaluaciju s obzirom na moguću kroničnu prisutnost uzročnika nevezano za akutnu bolest. Serološki testovi smataju se dijagnostičkom metodom izbora uz pravilnu interpretaciju rezultata. Iako daju retrospektivnu dijagnozu, dobrom suradnjom kliničara i mikrobiologa, utvrđivanje uzročnika može se postići u zadovoljavajućem vremenu.

### 1.1.8. Liječenje

Liječenje antibioticima znatno smanjuje trajanje respiratornih simptoma koje uzrokuje *M. pneumoniae*. Budući da nemaju staničnu stijenku mikoplazme su rezistentne na beta-laktamske antibiotike i glukopeptide. *In vitro* testovi pokazuju da *M. pneumoniae* inhibiraju tetraciklini, makrolidi, ketolidi i fluorokinoloni, dok su sulfonamidi, trimetoprim, polimiksin, nalidksična kiselina i rifampin također neučinkoviti u liječenju mikoplazmatske infekcije.<sup>72</sup> No, rezultati *in vitro* testova ne jamče učinkovitost antibiotika u liječenju respiratorne infekcije. Tako streptogramini, kloramfenikol i aminoglikozidi pokazuju *in vitro* inhibitornu aktivnost, no nisu učinkoviti u liječenju infekcija uzrokovanih mikoplazmom. Fluorokinoloni se ne preporučuju za djecu zbog mogućeg toksičnog učinka na hrskavicu. Isto tako, tetraciklini se ne primjenjuju u djece mlađe od 10 godina. Stoga su makrolidi lijek izbora za liječenje infekcije i u djece i u odraslih.<sup>73</sup> Noviji makrolidi, klaritromicin i azitromicin imaju jednak klinički učinak kao eritromicin, ali znatno bolju podnošljivost i manje nuspojave.<sup>74</sup> Kao alternativa za odrasle bolesnike nude se tetraciklini, poglavito doksiciklin, te fluorokinoloni.

Mišljenja u pogledu duljine liječenja nisu ujednačena. Neki autori preporučuju kratkotrajno liječenje, od 6 do 8 dana, dok drugi zagovaraju produženu antibiotsku terapiju kroz 2-3 tjedna. Liječenje azitromicinom traje tri dana u ukupnoj dozi od 1500 mg za odrasle, iako je opisano uspješno izliječenje i s jednokratnom dozom od 1500 mg.<sup>74,75</sup>



### 1.1.9. Sprječavanje

Ne postoji siguran postupak za sprječavanje infekcija i bolesti koje uzrokuje *M. pneumoniae*. Doduše, opisani su mnogi pokušaji profilaktičke primjene antibiotika za kontrolu epidemija s različitim uspjesima. U jednom istraživanju azitromicin je pokazao 75%-tnu učinkovitost u zaštiti od infekcije za vrijeme epidemije.<sup>76</sup> U drugom istraživanju u američkih vojnika, azitromicin u dozi od 500 mg tjedno pokazao je 64%-tnu učinkovitost u zaštiti od infekcije.<sup>77</sup>

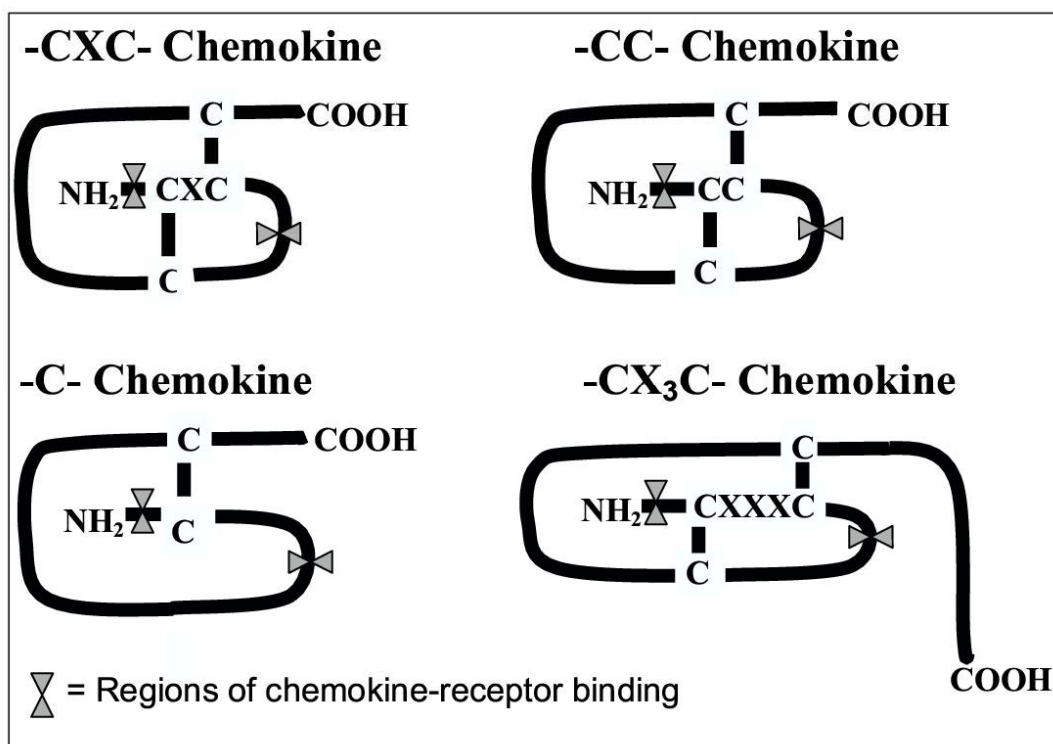
Zapravo cijepljenje bi bila jedina mogućnost u zaštiti i kontroli infekcije. Potreba za cijepljenjem proistječe iz visoke incidencije pneumonija koje uzrokuje *M. pneumoniae* u općoj populaciji, posebno u vojnim kolektivima, zbog produženog toka bolesti i dugotrajnog razdoblja infektivnosti. No, do danas se nije uspjelo pripremiti cjepivo koje bi udovoljilo kriterijima sigurnosti i visoke učinkovitosti.

## 1.2. KEMOKINI

### 1.2.1. Uvodni dio

Pojam kemokina uveden je i medicinsku terminologiju 1992. godine, a označava skraćeni naziv za kemotaksijske citoke (CHEMOtactic cytoKINES).<sup>78</sup> Do sada je u čovjeka otkriveno više od 50 kemokina koji tvore veliku porodicu medijatora upale i imunosti sa sličnostima, ali i razlikama u odnosu na citokine. Kemokini kao i citokini jesu sekretorni proteini koje proizvode leukociti i tkivne stanice konstitutivno ili nakon indukcije. Za razliku od citokina, kemokini su znatno manji i djeluju preko receptora povezanih G-proteinom koji su tipični za privlačenje leukocita. Kemokini se funkcionalno mogu podijeliti u dvije glavne skupine. Jedni su homeostatski, a proizvode se i secerniraju konstitutivno. Oni su općenito uključeni u promet limfocita, imunološki nadzor i lokalizaciju antigen prezentirajućih limfocita u imunološkom sustavu.<sup>79,80</sup> Druge kemokine produciraju same stanice tijekom infekcije ili oni slijede proupalni podražaj i promptnu migraciju leukocita na mjesto infekcije. Takvi inflamatorni kemokini mogu također aktivirati stanice da pojačaju imunološki odgovor i pomažu procesu cijeljenja rana.

Kemokini su solubilni proteini molekularne mase 6-14 kDa koji se sastoje od približno 70-130 aminokiselina.<sup>78</sup> Iako je sličnost u sekvenci aminokiselina između kemokina mala, njihova tercijska struktura je slična.<sup>81,82</sup> Većina kemokina posjeduje najmanje četiri cisteina koji tvore disulfidne veze, jednu između prvog i trećeg, a drugu između drugog i četvrtog cisteina (slika 2). S obzirom na položaj prva dva cisteina kemokini se mogu podijeliti u četiri podskupine: CXC (alfa), CC (beta), C (gama) i CX3C (delta). Dvije glavne skupine kemokina alfa (CXC) i beta (CC) se razlikuju s obzirom na poziciju prva dva cisteina koja su odijeljena jednom aminokiselinom (alfa) ili leže jedan do drugoga (beta). Prva dva cisteina delta (CX3C) kemokina su odijeljena s tri aminokiseline.<sup>83</sup> Gama (C) kemokini posjeduju samo dva cisteina koji odgovaraju drugom i četvrtom cisteinu drugih kemokina.<sup>84</sup>



## Slika 2. Kemokini

Prema: Townson DH, Liptak AR. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:94.

Kemokini kao kemotaksijski peptidi strukturno veoma slične svojim receptorima. Mnogi transdukcijski patofiziološki mehanizmi koji se aktiviraju nakon vezanja receptora su također jako slični.<sup>85</sup> Međutim, specifična ekspresija, regulacija i vezanje za receptore svakog pojedinog tvori funkcionalnu različitost koja omogućuje kemokinima da igraju važnu ulogu u mnogim procesima, kao što su organogeneza, hematopoeza, neuronska veza s mikroglijom i promet leukocita.<sup>86-89</sup> Alfa i beta kemokini imaju dva glavna mjesta koja se vežu s receptorima. Jedno je smješteno u amino-terminalnoj domeni koja se nalazi prije prvog cisteina i predstavlja najvarijabilnije područje kemokina. Broj i sastav aminokiselina NH<sub>2</sub> terminalne regije određuje hoće li spoj kemokina s receptorom imati agonistički ili antagonistički učinak.<sup>90</sup> Drugo mjesto koje služi za vezanje na receptor nalazi se unutar strukturnog zavoja iza drugog cisteina. Oba ova mjesta su u uskoj vezi s disulfidnim vezama. Receptor prepoznaje prvo vezno mjesto unutar zavojite regije koja djeluje kao «pristanišna domena». Ta interakcija ograničava pokretljivost kemokina i olakšava orijentaciju amino-terminalne «trigerirajuće domene» koja aktivira receptor.<sup>91</sup> Vezani

kemokini zadržavaju svoju punu kemotaksijsku aktivnost i ograničavaju se na mjesto gdje se proizvode i oslobađaju.<sup>92</sup>

Budući da se stalno otkrivaju nove kemokinske molekule bila je neophodna sustavna nomenklatura za kemokine i kemokinske receptore. Receptori su definirani kao CXC, CC, XC (X je umetnut da se razlikuje od receptora komplementa 1 CR1) i CX3C iza čega slijedi R i broj.<sup>93</sup> Kemokini su definirani s istim strukturno povezanim akronimom iza čega slijedi L i broj kemokinskog gena. Kemokinski geni su označeni kao SSC (small secreted cytokines) i numerirani kronološki. Dok je ova sustavna nomenklatura općenito prihvatljiva za receptore, kemokini se još uvijek označavaju njihovim uobičajenim imenima.

Do danas je otkriveno šest alfa i deset beta kemokinskih receptora, te receptori za limfotaktine i fraktalkin.<sup>94</sup> Iako većina receptora prepoznaje više od jednog kemokina, oni su ograničeni na istu podskupinu. Isto tako nekoliko kemokina se može vezati za više od jednog receptora.

Alfa kemokini uključuju 16 različitih kemokina. Oni se nadalje dijele obzirom na to posjeduju li tripeptid glutaminsku kiselinu-leucin-arginin u NH<sub>2</sub> terminalnoj regiji. Kemokini koji imaju spomenuti tripeptid (ELR+) vežu se za receptore CXCR1 i CXCR2 čija je ekspresija specifična za neutrofile. Produciraju ih različite vrste stanica kao odgovor na brojne stimulanse, poglavito proupalne citokine kao što su interleukin-1 (IL-1) i tumorski faktor nekroze (TNF).<sup>95</sup> Uloga ovih kemokina je olakšavanje adherencije neutrofila na endotelne stanice i posljedična migracija duž kemokinskog gradijenta. Oni također sudjeluju u angiogenezi i kemotaksiji endotelnih stanica.<sup>96</sup> Podskupina CXC kemokina koja ne posjeduje tripeptid (ELR-) privlače limfocite i monocite, dok imaju slabu kemotaksijsku aktivnost za neutrofile.<sup>97</sup> Aktivnost unutar te podskupine kemokina varira, iako većina posjeduje angiostatska i antiangiogenetska svojstva.<sup>97</sup>

Beta kemokini posjeduju 18 različitih kemokina. Primarno ciljno mjesto beta kemokina jesu mononuklearne stanice preko kojih posreduju proupalne i homeostatske mehanizme. Beta kemokini obično imaju četiri cisteina, iako neki posjeduju šest cisteina.<sup>93</sup> S obzirom na specifične aktivnosti i sličnosti u sekvencama aminokiselina, beta kemokini se mogu podijeliti u nekoliko podskupina: alergenski, proupalni, hemofiltrirajući, razvojni, homeostatski i ostali. Alergenski kemokini imaju sposobnost privlačenja eozinofila i bazofila i oslabljavanje histamina. Proupalna i hemofiltrirajuća podskupina imaju značajnu ulogu u procesima upale. Razvojna podskupina beta kemokina ima kemotaksijska svojstva

za dendritičke stanice, monocite i NK stanice. Ostali beta kemokini posjeduju homeostatske i inflamatorne karakteristike.

Gama kemokini strukturno su slični beta kemokinima, ali oni ne posjeduju jedan od dva N-terminalna cisteina. Gama kemokini uključuju dva vrlo slična kemokina, limfotaktin alfa i limfotaktin beta koji se razlikuju po sastavu dvije susjedne aminokiseline.<sup>98</sup>

Delta kemokini imaju samo jednog člana, (fraktalkin) koji posjeduje tri aminokiseline između prva dva cisteina. On ima snažnu kemotaksijsku aktivnost za T-limfocite i monocite.<sup>99</sup>

### 1.2.2. Interleukin – 8

Interleukin-8 (IL-8) je prvi otkriveni kemokin. Identificirali su ga japanski istraživači 1987. godine nakon što su supernatant kulture humanih monocita stimulirali s LPS-om.<sup>100,101</sup> U početku je bio nazvan čimbenik kemotaksije neutrofila koji potječe od monocita, da bi ga poslije zbog svojih brojnih funkcija nazvali interleukin-8. Tako se otkrilo da IL-8 inducira oslobađanje lizosomskih enzima iz neutrofila, ekspresiju adhezijskih molekula na neutrofilima, te kemotaksijsku aktivnost bazofila, eozinofila i T-limfocita.<sup>102-106</sup> Istraživanja *in vitro* potvrdila su brojne učinke na neutrofile, kao što su indukcija promjene oblika, oslobađanje lizosomskih enzima, stvaranje superoksida i vodikovog peroksida, stvaranje bioaktivnih lipida i povećana ekspresija adhezijskih molekula na neutrofilima.<sup>107,108</sup> *In vitro* IL-8 inducira kemotaksiju CD4+ i CD8+ humanih T-limfocita.<sup>107</sup> Intradermalna injekcija humanog IL-8 uzrokuje brzu infiltraciju neutrofila koja je ovisna o koncentraciji IL-8, te poslije migraciju T-limfocita na to mjesto.<sup>109</sup> U kasnijoj fazi potrošnja neutrofila smanjuje preko IL-8 induciranu migraciju CD4 T-limfocita što potvrđuje da IL-8 inducira migraciju CD4 T-limfocita indirektno, preko kemotaksije neutrofila.<sup>110</sup>

Istraživanja *in vitro* su otkrila utjecaj IL-8 na neke druge stanice u organizmu, kao što su stanice melanoma, fibroblasti i endotelne stanice umbilikalne vene. Stanice melanoma posjeduju specifični receptor za IL-8, a *in vitro* mogu producirati IL-8.<sup>111</sup> S druge strane, IL-8 pojačava proliferaciju nekih linija stanica melanoma što upućuje da je IL-8 uključen u progresiju melanoma.<sup>112</sup> Isto tako, *in vitro* istraživanja su potvrdila da IL-8 znatno inhibira antivirusnu aktivnost alfa-interferona.<sup>113</sup>

IL-8 posjeduje tripeptid ELR prije prvog cisteina, što mu omogućuje kemotaksijsku aktivnost za neutrofile. U istraživanjima *in vivo* dokazano je da produkcija IL-8 od strane tumorskih stanica može regulirati neovaskularizaciju, te eventualni rast tumora i metastaza.<sup>114</sup> Nadalje, proizvodnja IL-8 kao odgovor na oštećenje tkiva može inducirati cijeljenje rana tako da potiče angiogenezu.

Neka istraživanja sugeriraju ulogu IL-8 u patogenezi adultnog respiratornog distres sindroma (ARDS) privlačenjem i aktivacijom neutrofila. U bolesnika s ARDS-om otkrivena je povišena koncentracija IL-8 u BAL-u.<sup>115</sup> Isto tako, u rizičnoj skupini bolesnika koncentracija IL-8 na početku bolesti kolerira s incidencijom razvija ARDS-a.<sup>116</sup>

Istraživanje na mišjim modelima je potvrdilo da tretman anti-IL-8 protutijelima prevenira u značajnoj mjeri razvoj ARDS-a u usporedbi s kontrolnom skupinom.<sup>117</sup>

IL-8 se smatra glavnim medijatorom odgovornim za infiltraciju neutrofilima i rano reperfuzijsko oštećenje tkiva.<sup>118</sup> U bolesnika s moždanim infarktom često se registrira infiltracija neutrofilima u ishemijsko područje koja kolerira s težinom neurološkog deficita.<sup>119</sup>

U jednom istraživanju otkrivena je povišena koncentracija IL-8 u nekim tipovima glomerulonefritisa, poglavito onim koji su karakterizirani patološkom infiltracijom neutrofila u glomerulima.<sup>120</sup> Koncentracija IL-8 u urinu kolerira s brojem leukocita u glomerulima što upućuje na ulogu IL-8 u patogenezi tih tipova glomerulonefritisa putem aktivacije neutrofila.

### 1.2.3. Kemotaksijski protein monocita - 1 (MCP-1)

Kemotaksijski proteini monocita (MCPs) porodica su beta kemokina s različitim funkcijama. Do sada su otkrivena četiri MCPs (1-4).<sup>121</sup> Svi humani MCPs snažno privlače monocite, T-limfocite, NK stanice i dendritičke stanice.<sup>122</sup> Svi se vežu na izomere CCR2 receptora (CCR2a i b) i CCR9, a neki kemotaksijski proteini monocita se mogu vezati na CCR1 i CCR3.<sup>121-123</sup>

MCP-1 je purificiran kao čimbenik kemotaksije monocita iz supernatanta kulture različitih tipova stanica.<sup>124</sup> Daljnja istraživanja su otkrila brojne funkcije MCP-1 preko monocitno-makrofagnog sustava. MCP-1 inducira ulazak kalcija u stanicu, ekspresiju adhezijskih molekula i oslobađanje lizosomalnih enzima u monocitima.<sup>125,126</sup> MCP-1 inducira monocite da produciraju tkivni faktor i proupalne citokine, kao što su IL-1 i IL-6 i pojačava aktivnost monocita protiv različitih tipova malignih stanica.<sup>127</sup>

Pored tih učinaka na sustav monocita-makrofaga, MCP-1 inducira kemotaksiju, oslobađanje histamina i leukotriena i ulazak kalcija u bazofile.<sup>128</sup> Osim toga, MCP-1 pojačava kemotaksiju i CD4+ i CD8+ limfocita, te inducira *in vitro* kemotaksiju NK stanica s unutarstaničnim ulaskom kalcija.<sup>129,130</sup> Osim MCP-1 u čovjeka su otkrivena još tri proteina kemotaksije monocita, MCP-2, MCP-3 i MCP-4.<sup>131</sup> Oni *in vitro* pokazuju sličnu aktivnost prema monocitima, T-limfocitima i NK stanicama kao i MCP-1 iako se razlikuju u potencijalu prema pojedinim ciljnim stanicama.<sup>132,133</sup>

Dokazana je prisutnost specifičnih receptora za MCP-1 na glatkim mišićnim stanicama krvnih žila i fibroblastima. MCP-1 inducira *in vitro* migraciju glatkih mišićnih stanica.<sup>134</sup> Ti rezultati sugeriraju potencijalnu ulogu MCP-1 u karakterističnim aspektima upale, remodeliranju vaskularnih struktura i fibrozi.

Dokazana je povišena razina MCP-1 u BAL-u u bolesnika s ARDS-om, a ona je u korelaciji sa stupnjem oštećenja pluća u kasnijoj fazi ARDS-a, što upućuje na ulogu MCP-1 u oštećenju tkiva u kroničnoj fazi ARDS-a.<sup>135</sup>



#### 1.2.4. Upalni protein makrofaga - 1 (MIP-1 $\beta$ )

Do sada su otkrivena četiri člana porodice upalnih proteina makrofaga (MIP) koji se na osnovu novije nomenklature nazivaju: CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL9 (MIP-1 $\delta$ ) i CCL15 (MIP-1 $\gamma$ ).<sup>136</sup> Produciraju ih brojne vrste stanica, osobito makrofagi, dendritičke stanice i limfociti. Vežu i aktiviraju beta kemokinske receptore, poglavito CCR1, CCR3 i CCR5. MIP-1 pokazuju visoku specifičnost za receptore iako MIP-1 receptori vežu nekoliko različitih kemokina.

MIP-1 su mali (8-10 kDa) strukturno povezani, inducibilni, sekretorni i proinflamatorni kemokini. MIP-1 $\beta$  je kodiran genima koji se sastoje od tri eksona i dva introna, a smješteni su na 11. i 17. kromosomu.<sup>137</sup>

U većini zrelih hematopoetskih stanica geni za MIP-1 $\beta$  su inducibilni. Stanice koje su direktno uključene u imunološki odgovor, kao što su makrofagi/monociti, T i B-limfociti, neutrofilni, dendritičke stanice, mastociti i NK stanice mogu producirati veliku količinu MIP-1 $\beta$ . Trombociti, osteoblasti, astrociti i mikroglia, epitelne stanice i fibroblasti nakon stimulacije produciraju manju količinu MIP-1 $\beta$ . Za sintezu i oslobađanje MIP-1 $\beta$  potrebna je stanična aktivacija, iako se manje količine ekspresije ponekad mogu otkriti i u nestimuliranim stanicama kao što su neutrofilni. Produkcija MIP-1 $\beta$  može biti inducirana različitim proinflamatornim agensima/citokinima, kao što su lipopolisaharid (LPS), virusna infekcija, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 i drugi. S druge strane, tretman s IL-4, IL-10, deksametazonom smanjuje ekspresiju MIP-1 $\beta$ .<sup>137</sup>

Vežanje MIP-1 $\beta$  na receptor dovodi do interakcije i posljedične kaskade intracelularnih događanja koja brzo potiču brojne funkcije ciljnih stanica kao što su, kemotaksija, degranulacija, fagocitoza i sinteza medijatora.<sup>138</sup>

MIP-1 porodica dirigira akutnim i kroničnim upalnim odgovorom domaćina na mjestu ozljede ili infekcije tako da privlači proupalne stanice. Oni su neophodni za kemotaksiju T-limfocita iz cirkulacije na mjesto upale, kao i za regulaciju transendotelne migracije monocita, dendritičkih stanica i NK stanica. Za razliku od toga, manji je kemotaksijski učinak na neutrofile i eozinofile. Nakon što MIP-1 aktivira kemokinske receptore može doći do oslobađanja kalcija, aktivacije i oslobađanja proupalnih medijatora, kao što su leukotrien-4, arahidonska kiselina i histamin. Pored toga, MIP-1 mogu regulirati imunološki odgovor moduliranjem Th diferencijacije, MIP-1 $\beta$  omogućuje ekspresiju Th2 staničnog odgovora.<sup>139</sup>

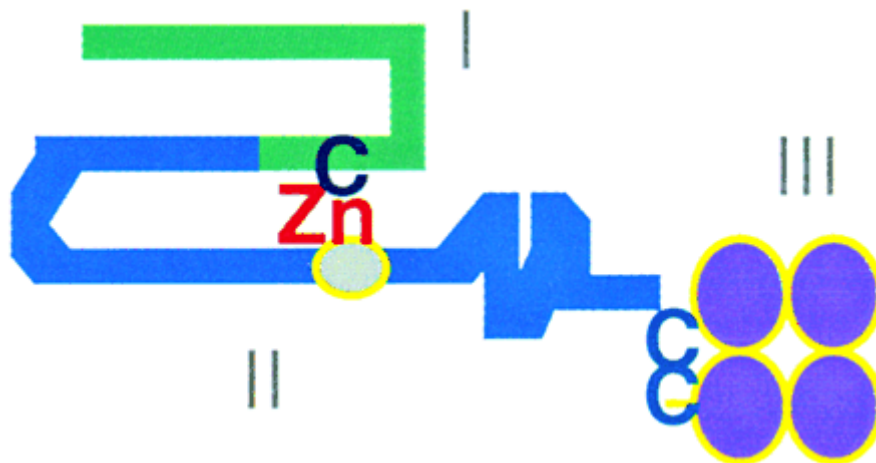
Stoga ne čudi da MIP-1 igraju ključnu ulogu u patogenezi brojnih upalnih stanja i bolesti, kao što su astma, formiranje granuloma, cijeljenje rana, artritis, multipla skleroza, pneumonija i psorijaza.<sup>140</sup> MIP-1 mogu inducirati upalni odgovor protiv infektivnih uzročnika, kao što su virusi ili paraziti.<sup>137,141</sup>

## 1.3. MATRIKS METALOPROTEINAZE

### 1.3.1. Uvodni dio

Izvanstanični matriks (ECM, od engl. *extracellular matrix*) predstavlja kompleksnu mrežu strukturalnih i funkcionalnih makromolekula koje imaju važnu ulogu u morfogenezi organa i tkiva te u održavanju stanične i tkivne strukture i funkcije.<sup>142</sup> Međutim, osim utjecaja ECM-a na fiziološke procese, sve se više pojavljuju i pokazatelji o njegovoj ulozi tijekom patoloških stanja, osobito prilikom odgovora domaćina na infekcije. Matriks metaloproteinaze (MMP) predstavljaju porodicu strukturno sličnih proteinaza koje razgrađuju ECM.<sup>143</sup> Do sada je otkriveno više od 20 MMP. One se dijele na osnovi specifičnosti njihovog supstrata i funkcije na gelatinaze (MMP-2, MMP-9), kolagenaze (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelizine (MMP-3, MMP-10), membranske vrste MMP (MT-MMP, MT1-MMP, MT1-MMP-3), te druge kao što su matrilizin (MMP-7), stromelizin 3 (MMP-11) i metaloelastaze (MMP-12).<sup>143,144</sup>

Strukturna domena metaloproteinaza sastoji se od tri područja: proenzimske domene (I), katalitičke domene (II) i C-terminalne domene (III) za koju se smatra da definira specifični supstrat (slika 3). Cink (Zn) u katalitičkoj domeni stupa u interakciju s konzerviranim cisteinom (C) u domeni I i tako održava proenzim u inaktivnoj formi. Gelatinaze (MMP-2, MMP-9) uz to imaju i dodatnu domenu s tri kaskadna spoja koja se ponavljaju i slične fibronektinu tip II, a cijepaju katalitičko područje te stupaju u interakciju s kolagenima i gelatinima.<sup>145</sup> Gelatinaza B (MMP-9) ima regiju koja je homologna kolagenu tip V.



**Slika 3.** Matriks metaloproteinaza

Prema: Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1100-2.<sup>146</sup>

Proizvodnja i aktivnost MMP je visoko regulirana, osim neutrofilne kolagenaze i gelatinaze B koje su smještene u sekundarnim i tercijarnim granulama da bi se mogle brzo osloboditi. U normalnim okolnostima tkiva ne pohranjuju MMP i njihova konstitutivna ekspresija je minimalna. Ekspresija MMP je regulirana faktorima rasta, citokinima, kemijskim agensima, fizikalnim stresom i ECM-om. MMP secerniraju različite vrste stanica u inaktivnoj formi, a proteolitička im je aktivnost u tkivima regulirana enzimskom aktivacijom i inhibicijom.<sup>146</sup> Budući da imaju sposobnost katalizirati degradaciju strukturnih proteina ECM, pretpostavlja se da je njihova glavna uloga u fiziološkom remodeliranju tkiva za vrijeme razvoja, rasta, uterinog ciklusa, postpartalne involucije i reparacije ozljeda.<sup>146-148</sup>

Nekontrolirana ekspresija MMP može uzrokovati oštećenja tkiva i dovesti do razvoja brojnih destruktivnih bolesti, kao što su artritis, ruptura aterosklerotskog plaka, aneurizma aorte i progresija tumora.<sup>143</sup> Isto tako MMP se povezuje s različitim plućnim bolestima, uključujući astmu, KOPB, ARDS i pleuritis.<sup>149</sup>

Vjeruje se da MMP imaju važnu ulogu u patogenezi akutnih i kroničnih destruktivnih bolesti preko degradacije ECM. Neravnoteža između ekspresije i inhibicije MMP generira destrukciju tkiva ili abnormalnu reparaciju tkiva.<sup>147</sup> Bazalna membrana je poseban oblik ECM-a. Značajan dio strukture bazalne membrane u plućima čini kompleks kolagena tip IV koji ima važnu ulogu u održavanju strukturnog integriteta zidova alveola. Pojedine MMP, kao što su gelatinaze (MMP-2, MMP-9) imaju sposobnost prekida kolagena,

odnosno degradacije struktura bazalne membrane jer posjeduju supstrat koji je specifičan za kolagen tip IV.<sup>145</sup>

Prekidanje izvanstaničnog matriksa može dodatno utjecati na strukturnu nestabilnost.<sup>146</sup> Stanice u kontaktu s intaktnim ECM normalno funkcioniraju. Međutim, kontakt s promijenjenim ili prekinutim ECM trigerira brojne patofiziološke signale koji rezultiraju različitim staničnim odgovorima. MMP mogu cijepati različite proteine koji ne pripadaju ECM-u generirajući biološke procese. Isto tako, MMP imaju sposobnost oslobađati različite bioaktivne molekule s površine stanice, kao što su TNF- $\alpha$ , L-selektin, IL-6 i druge.<sup>150</sup> Na taj način MMP mogu biti uključene u kontrolu stanične smrti, upale, infekcije i angiogeneze.

Najvažniji nespecifični inhibitor MMP je  $\alpha$ 2-makroglobulin.<sup>151</sup> *In vivo* MMP se inaktiviraju uglavnom preko tkivnih inhibitora (TIMP) koji se vežu s visokim afinitetom na katalitičko mjesto MMP.<sup>152</sup> Do sada su otkrivena četiri homologna TIMP-a (TIMP1-TIMP4). TIMP produciraju različite vrste stanica, kao što su makrofagi, fibroblasti i polimorfonukleari.<sup>153,154</sup>

### 1.3.2. Matriks metaloproteinaze - 2 i - 9 (MMP-2 i MMP-9)

MMP-2 secerniraju u prvom redu fibroblasti i epitelne stanice, dok su neutrofilni glavni izvor MMP-9.<sup>155</sup> Pored toga, MMP-9 proizvode i druge vrste stanica kao što su makrofagi, epitelne stanice i fibroblasti.<sup>155</sup> MMP-2 i MMP-9 pripadaju grupi gelatinaza koje su od posebnog interesa jer imaju sposobnost degradirati elastin i kolagen tip IV, glavne komponente bazalnih membrana.<sup>145</sup> Na taj način mogu utjecati na rano remodeliranje tkiva nakon oštećenja parenhima, odnosno alveola u plućima.<sup>156,157</sup> Isto tako, imaju ključnu ulogu u migaciji brojnih leukocitnih populacija, kao što su T-limfociti i neutrofilni preko bazalne membrane alveola.<sup>158</sup>

Glavna uloga MMP u plućima je održavanje njihove arhitekture. MMP su uključene u normalan razvoj pluća. No, disregulacija produkcije, sekrecije i aktivacije MMP i njihovih TIMP može dovesti do brojnih patoloških stanja u plućima. U jednom istraživanju otkrivena je pet puta veća koncentracija MMP-9 od MMP-2 u aspiratu traheje u djece s respiratornom infekcijom.<sup>159</sup> Isto tako, potvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije MMP-9 u dišnim sekretima, te makrofaga, neutrofila i eozinofila u bolesnika s egzacerbacijom astme.<sup>160</sup>

U idiopatskoj plućnoj fibrozi (IPF) MMP-2 i MMP-9 destrukcijom subepitelne bazalne membrane utječu na rano remodeliranje alveola. Prekid bazalne membrane omogućuje ulazak upalnih i intersticijskih stanica u alveolarni prostor dovodeći do destrukcije tkiva i intraalveolarne fibroze. U IPF makrofagi, regenerirane i metaplastičke epitelne stanice, te neutrofilni glavni su izvor MMP-9, dok su makrofagi, fibroblasti i regenerirani pneumociti tipa II glavni izvor MMP-2. Dokazana je pozitivna korelacija između aktivnosti MMP-9 i povećanja broja neutrofila u BAL-u u tih bolesnika, odnosno MMP-2 i limfocita.<sup>161</sup> U drugom istraživanju otkrivena je pozitivna korelacija razine MMP-2 i MMP-9 i broja neutrofila u BAL-u u bolesnika s ARDS-om.<sup>162</sup> Iako je dokazana povišena ekspresija MMP-9 u kroničnim upalnim bolestima pluća, kao što su astma, IPF i KOPB, nije poznato je li MMP-9 uzrok remodeliranja pluća ili je dio upalnih i reperativnih odgovora pluća na stimulus.<sup>163</sup>

Iako nije poznat mehanizam nastanka, povišene vrijednosti MMP-2 i MMP-9 dokazane su i u nekim drugim bolestima, kao što su angina pectoris, akutna koronarna bolest i arteriovenska malformacija mozga.<sup>164,165</sup>

## 1.4. ULOGA KEMOKINA I METALOPROTEINAZA U IMUNOPATOGENEZI PNEUMONIJA

Kemokini kao i metaloproteinaze pripadaju skupini proupalnih proteina koji imaju važnu ulogu u migraciji upalnih stanica tijekom infekcije. No, još postoji dosta nepoznanica o njihovoj ulozi u imunopatogenezi pneumonija, kao i njihovim međusobnim odnosima. Nekoliko istraživanja je pokazalo da specifične MMP kontroliraju aktivnost kemokina. MMP-9 može dovesti do gubitka kemotaksijske aktivnosti nekoliko različitih kemokina (ENA-78, GCP-2), ali zanimljivo je da povisuje kemotaksijsku aktivnost IL-8.<sup>166,167</sup> S druge strane, IL-8 inducira brzo oslobađanje MMP-9 iz sekundarnih granula leukocita, što rezultira pozitivnom povratnom vezom te dvije molekule.<sup>166</sup>

Primarno mjesto *M. pneumoniae* infekcije u plućima je cilijarni epitel dišnog sustava koji je prisutan u velikim i malim dišnim putovima. Epitel dišnog sustava je značajna strukturna i funkcionalna granica između okoliša i imunološkog sustava pluća. Uzročnici koji stignu u donji dio dišnog sustava najprije dolaze u interakciju s epitelnim stanicama koji odgovaraju produkcijom različitih medijatora upale, uključujući metaloproteinaze i kemokine koji imaju sposobnost privući i aktivirati upalne stanice na mjestu infekcije. Aktivirani makrofagi započinju fagocitozu te prolaze kemotaksijskom migracijom na mjesto infekcije. Visok postotak neutrofila i limfocita je prisutan u alveolarnoj tekućini. CD4 T-limfociti, B-limfociti i plazma stanice infiltriraju pluća što se rendgenski manifestira infiltratom na plućima. Nakon toga slijedi integracija lokalnog i perifernog imunološkog sustava i izazivanje odgovarajućeg odgovora. Imunološki odgovor je povezan s proliferacijom limfocita, produkcijom imunoglobulina i oslobađanjem različitih citokina i kemokina koje je potvrđeno u brojnim kliničkim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, životinjskim modelima i kliničkim istraživanjima u čovjeka.

### 1.4.1. Istraživanja *in vitro* i *in vivo*

*In vitro* istraživanja su potvrdila da su epitelne stanice velikih i malih dišnih putova prijамčljive za *M. pneumoniae* infekciju, no mogu izazvati različit imunološki odgovor vjerojatno zbog različitih intrizičkih svojstava na egzogene podražaje.

U jednom radu dokazano je da ICAM-1 (od engl. intercellular adhesion molecule-1) igra bitnu ulogu tijekom upale pluća. Njena pojačana ekspresija na pneumocitima tipa I nakon stimulacije lipopolisaharidom dovodi do pojačane atherencije neutrofila i makrofaga.<sup>168</sup> Za pojačan ulazak monocita u alveole potrebna je indukcija MCP-1 i još nekih kemokina koji značajno pojačavaju transepitelni transport monocita.<sup>169</sup> Tijekom tog procesa registrirane se u brojne adhezijske interakcije koje pridonose pojačanom transportu monocita.

Treba imati na umu da rezultati istraživanja *in vitro* ne oponašaju uvijek imunološki odgovor domaćina *in vivo*. Serum u mediju stanične kulture može također utjecati na citokinski/kemokinski odgovor tijekom infekcije koju uzrokuje *M. pneumoniae*.

Yang i sur. su istraživali citokinski i kemokinski odgovor epitelnih stanica dišnog sustava na infekciju *M. pneumoniae*.<sup>170</sup> Otkrili su da infekcija uzrokuje povećanu indukciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-8, ali ne IFN- $\gamma$  i IL-6. Uz to je potvrđeno da je citadherencija mikoplazme bila značajna za indukciju citokina i kemokina, a epitelne stanice dišnog sustava su kao dio lokalnog staničnog odgovora na infekciju mikoplazmom važan izvor citokina i kemokina. Mikoplazma također može inducirati produkciju citokina u humanim monocitima/limfocitima, ali se to događa kasnije tijekom infekcije. Kazachkov i sur. su otkrili da epitelne stanice dišnog sustava nakon infekcije *M. pneumoniae* ne oslobađaju veće koncentracije IL-8 i RANTES-a (od engl. regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted).<sup>171</sup> S druge strane, mononuklearne stanice periferne krvi inficirane mikoplazmom secerniraju značajnu koncentraciju IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$ . U jednom drugom istraživanju nakon inficiranja mononuklearnih stanica mikoplazmom registrira se pojačana produkcija IFN- $\alpha$ , IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ .<sup>172</sup>



### 1.4.2. Istraživanja na životinjskim modelima

Istraživanja na miševima potvrdila ulogu MMP u patogenezi nekih plućnih bolesti, no malo je radova koji se bave ulogom metaloproteinaza u pneumonijama. Baluk i sur. su otkrili povišenu koncentraciju MMP-2 i MMP-9 u miševa prethodno inficiranih s *M. pulmonis*.<sup>173</sup>

S druge strane, publicirano je mnogo radova o ulozi citokina/kemokina na životinjskim, poglavito mišjim modelima. Tako je u jednom istraživanju na miševima istraživana ekspresija citokina/kemokina u plućima i slezeni tijekom infekcije *M. pneumoniae*. Za vrijeme akutne faze primoinfekcije, kao i reinfekcije registrira se pojačana ekspresija TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, dok je ekspresija IL-2 i IL-2R registrirana samo tijekom reinfekcije. Ekspresija je veća u plućima nego u slezeni što govori za brzo nagomilavanje limfocita na mjestu infekcije. Tijekom reinfekcije, ekspresija TNF- $\alpha$  i IL-6 je 10 puta, a IFN- $\gamma$  50 puta veća nego u primoinfekciji što sugerira da patogenezu *M. pneumoniae* infekcije može biti povezana s povišenom ekspresijom proupalnih citokina.<sup>174</sup> U drugom istraživanju nakon eksperimentalne infekcije *M. pneumoniae* u miševa dokazana je povišena koncentracija TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$  i MCP-1, ali ne i IL-4 i IL-10 u BAL-u.<sup>175</sup>

Sun i sur. su ispitivali ekspresiju 143 različita citokina/kemokina ili njihovih receptora u tkivu pluća osjetljivih (BALB/c i C3H/HeN) i rezistentnih (C57BL/6) miševa nakon infekcije *M. pulmonis*.<sup>176</sup> Postoji jasna povezanost između patogeneze bolesti i ekspresije citokina i kemokina. Osjetljivi sojevi miševa pokazuju sličnu gensku ekspresiju citokina/kemokina u analizi 14 dana nakon infekcije, dok je u rezistentnih miševa ograničen citokinski/kemokinski odgovor. Osjetljivi miševi produciraju širok asortiman citokina/kemokina i plućima kao odgovor na infekciju mikoplazmom. Tako je otkriveno da proupalni citokin IL-10 pokazuje pojačanu ekspresiju u plućima koja je u korelaciji s težinom bolesti. Ekspresija IL-10 u tkivu pluća se progresivno povećava iza sedmog dana infekcije. Mnogi od kemokina koji su otkriveni (MIP-2, MIP-3 $\alpha$ , MCP-4, MIP-1 $\beta$ , MIG, BLC/BCA-1) imaju kemotaksijska svojstva za upalne stanice kao što su neutrofil, monociti/makrofagi i limfociti. Isto tako povišena je razina brojnih kemokinskih receptora. Može se reći da brojni citokini/kemokini koji su producirani vjerojatno igraju ulogu u privlačenju i održavanju imunoloških stanica koje su uključene u imunopatologiju plućne infekcije mikoplazmom.

U drugom istraživanju na miševima inficiranim *M. pulmonis* analizirana je ekspresija beta kemokina: MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1 i RANTES-a u plućima.<sup>177</sup> Dokazana je pojačana ekspresija MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i MCP-1, ali ne i RANTES-a. Imunofluorescentnim bojenjem pluća inficiranih miševa dokazano je da je pojačana ekspresija beta kemokina povezana s infiltracijom mononuklearnih stanica u plućima. Time je dokazana njihova uloga u kaskadi upalnih procesa tijekom mikoplazmatske infekcije zajedno s dugim citokinima/kemokinima.

Jones i sur. su otkrili da su T-limfociti glavna populacija limfocita koja uzrokuje plućne infiltrate u miševa inficiranim *M. pulmonis* s dominacijom CD4 T-limfocita u plućima i u limfnim čvorovima donjeg dišnog sustava, dok je broj CD8 T-limfocita u plućima tek blago povišen.<sup>178</sup> Limfociti u inficiranih miševa produciraju IL-4 (Th-2 imunološki odgovor) u limfnim čvorovima donjeg dijela dišnog sustava, a u slezeni IFN- $\gamma$  (Th-1 imunološki odgovor), dok se u plućima registriraju i IL-4 i IFN- $\gamma$ . Taj podatak pokazuje da regionalne razlike u imunološkom odgovoru na infekciju mikoplazmom mogu imati učinak na domaćina. Faulkner i sur. su registrirali različitu koncentraciju citokina/kemokina u BAL-u i serumu miševa inficiranih mikoplazmom što sugerira da treba razlikovati lokalni od sistemskog citokinskog odgovora domaćina.<sup>30</sup>

### 1.4.3. Klinička istraživanja u čovjeka

Postoji dosta radova koji opisuju ulogu proinflammatoryh citokina/kemokina i metaloproteinaza u tijeku pneumonije u djece i odraslih, te manji broj o njihovoj ulozi u imunopatogenezi pneumonije koju uzrokuje *M. pneumoniae*.

U istraživanju Hartoga i sur. u bolesnika s pneumonijama otkrivene su deseterostruko povišene koncentracije MMP-8 i MMP-9 u BAL-u.<sup>179</sup> Razina MMP-9 bila je u korelaciji s težinom kliničke slike bolesti. Aktivirani neutrofilu u plućima bili su glavni izvor MMP-9. Yang i sur. opisuju povišenu koncentraciju MMP-9 u bolesnika s pneumonijom koja je u korelaciji s brojem leukocita.<sup>180</sup> U bolesnika s pneumonijom polimorfonukleari ulaze u alveolarne prostore i secerniraju različite enzime koji su pohranjeni u granulama i vezikulama, uključujući i MMP-9. U drugom istraživanju otkrivena je pet puta veća koncentracija MMP-9 od MMP-2 u aspiratu traheje u djece s plućnim bolestima.<sup>159</sup> Isto tako, potvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije MMP-9 u dišnim sekretima, te makrofaga, neutrofila i eozinofila u bolesnika s egzacerbacijom astme.<sup>160</sup>

Hayashi i sur. su istraživali klonove limfocita u perifernoj krvi i BAL-u bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*.<sup>26</sup> Broj CD4 T-limfocita, kao i odnos CD4/CD8 T-limfocita bio je smanjen u perifernoj krvi, dok je registrirana veći broj aktiviranih T-limfocita i odnos CD4/CD8 u BAL-u. Isto tako, Koh i sur. su istraživali stanične elemente i koncentraciju citokina/kemokina u BAL-u bolesnika s pneumokoknom i mikoplazmatskom pneumonijom, te u kontrolnoj skupini.<sup>181</sup> Otkrili su da pneumokokna pneumonija ima veći broj leukocita u BAL-u nego druge dvije skupine, a postotak neutrofila je veći u obje skupine bolesnika s pneumonijom. Isto tako, bolesnici s mikoplazmom imaju značajno veći broj limfocita nego druge dvije skupine ispitanika, te značajno veću koncentraciju IL-4 u BAL-u, te IgE koncentraciju u serumu.

Kragstjerg i sur. u svom radu uspoređuju vrijednosti nekih citokina i kemokina u bolesnika s pneumonijama različite etiologije.<sup>182</sup> Znatno višu koncentraciju interleukina-8 otkrili su u bolesnika s pneumokoknom i mikoplazmatskom pneumonijom, nego u bolesnika s klamidijском pneumonijom i legionarskom bolešću. U dva istraživanja autori su našli pozitivnu korelaciju između serumske koncentracije specifičnih citokina/kemokina i težeg oblika mikoplazmatske infekcije.<sup>183,184</sup> Između induciranih citokina, IL-8 očito igra značajnu ulogu tako da snažno privlači i aktivira neutrofile, monocite i T-limfocite i stoga je najvažniji za ulazak neutrofila u pluća tijekom bakterijske infekcije.<sup>185</sup> Isto tako, Narita i

sur. potvrđuju ulogu interleukina-8 u patomehanizmima nastanka mikoplazmatske pneumonije.<sup>186</sup> U istraživanju u djece s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*, otkrilo se da je serumska koncentracija IL-6 indikator težine bolesti, za razliku od TNF- $\alpha$ .<sup>187</sup> Lieberman i sur. su uspoređivali serumske koncentracije IL-1 $\beta$  i IL-6 u bolesnika s mikoplazmatskom i pneumokoknom pneumonijom.<sup>188</sup> Otkrili su da je koncentracija IL-6 značajno viša u bolesnika s pneumokoknom pneumonijom, a IL-1 $\beta$  u mikoplazmatskoj skupini. U jednom radu registrirana je povišena vrijednost IL-18, a njegova vrijednost kolerira s težinom bolesti mikoplazmatske pneumonije, odnosno brojem zahvaćenih režnjeva registriranih kompjuteriziranom tomografijom (CT).<sup>189</sup> Uz to, serumska koncentracija IL-18 je korelirala s razinom s IL-2R, ali ne s IFN- $\gamma$  ili IL-12 što sugerira da IL-18 može igrati značajnu ulogu u razvoju plućnih manifestacija *M. pneumoniae* preko aktivacije T-limfocita.

Sumirajući rezultate brojnih dosadašnjih istraživanja o imunološkim procesima u tijeku mikoplazmatske pneumonije može se reći da još uvijek postoji dosta nepoznanica u imunopatogenezi te infekcije. *M. pneumoniae* je sposobna inducirati mnoge citokine/kemokine u različitim modelima dovodeći do zaključka da oni mogu jednim dijelom biti odgovorni za patogenezu infekcije u različitim oblicima bolesti. Točan mehanizam kako mikoplazma inducira citokine ostaje nejasan. Iako je citadherencija važna za indukciju citokina, u to su uključeni i neki drugi mehanizmi. Vežanje mikoplazme za stanicu domaćina je posredovano organelama atherencije u kojima su locirani neki adhezini i proteini. Zbog brojnih čimbenika koji sudjeluju u citadherenciji ne čudi razlika u indukciji citokina tijekom infekcije *M. pneumoniae*. Isto tako još nije jasno koji citokini/kemokini su predominantno odgovorni za patohistološka oštećenja pluća. S druge strane, varijacije u imunološkom odgovoru domaćina mogu biti odgovorne za različitu prezentaciju bolesti za vrijeme mikoplazmatske infekcije.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom radu će se istražiti i znanstveno evaluirati uloga  $\beta$ -kemokina i metaloproteinaza u imunopatogenezi pneumonije koju uzrokuje mikoplazma pneumonije. U kontrolnoj skupini su zdravi dobrovoljci istog spola i približno iste dobi. Rad će obuhvatiti analizu anamnestičkih, kliničkih, laboratorijskih i rendgenskih karakteristika bolesnika s mikoplazmatskom pneumonijom, te praćenje težine i ishoda bolesti. Cilj ovog rada jest istražiti i utvrditi:

1. Dolazi li u bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje mikoplazma pneumonije do lučenja  $\beta$ -kemokina i metaloproteinaza
  2. Jesu li vrijednosti imunoloških parametara u korelaciji s težinom kliničke slike i laboratorijskim nalazima
  3. Imaju li testirani imunološki parametri prognostičko značenje za tijek, težinu i ishod i bolesti
  4. Međusobni dinamički odnos kemokina i metaloproteinaza, što bi trebalo pružiti inicijalne informacije o mogućem utjecaju metaloproteinaza na aktivnost i gradijent kemokina u bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*
- Svi navedeni pokazatelji istodobno će se pratiti i analizirati i u kontrolnoj skupini.

Polazne hipoteze ovoga rada jesu:

1. U bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje mikoplazma pneumonije nalazi se povišena razina IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\beta$  u sistemskoj cirkulaciji
2. U bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje mikoplazma pneumonije dolazi do produkcije MMP-2 i MMP-9, što je moguće mjeriti u u sistemskoj cirkulaciji
3. Razina  $\beta$ -kemokina u sistemskoj cirkulaciji je u korelaciji s kliničkim tijekom bolesti
4. Klinički tijek bolesti je teži u bolesnika s višim vrijednostima metaloproteinaza (MMP-2, MMP-9) u odnosu na bolesnike s nižim vrijednostima
5. Vrijednosti mjerenih imunoloških parametara mogu se dovesti u korelaciju s rutinskim laboratorijskim nalazima, kao i u međusobnu korelaciju

Do sada nije publicirano kompletnije istraživanje o ulozi  $\beta$ -kemokina i metaloproteinaza na nastanak, tijek, težinu i ishod pneumonije koje uzrokuje *M. pneumoniae*. Većina dosadašnjih radova o imunopatogenetskim mehanizmima koje uzrokuje *M. pneumoniae* rađena je *in vitro* ili *in vivo* uglavnom na mišjim modelima. Gotovo da nema značajnijih

saznanja o imunopatogenetskim mehanizmima u ljudi. Zato će se u ovom radu na primjerenom kliničkom uzorku testirati polazne hipoteze.

U ovom se radu očekuju sljedeća saznanja:

5. Prvi put će biti pokazana dinamika beta-kemokina i metaloproteinaza u sistemskoj cirkulaciji u bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*. Usporedbom dinamike imunoloških parametara s dinamikom kliničkih i laboratorijskih promjena očekujemo bolje razumijevanje imunopatogenetskih mehanizama bolesti, te njihovu prognostičku ulogu u razvoju i ishodu bolesti.
6. Bit će pokazan međusobni dinamički odnos kemokina i metaloproteinaza u bolesnika, što bi trebalo omogućiti inicijalne informacije o mogućem utjecaju metaloproteinaza na aktivnost i gradijent kemokina *ex vivo*. Za sada ne postoje takva istraživanja u ljudi.
7. Ova nova saznanja mogla bi omogućiti racionalniji i uspješniji pristup liječenju, osobito kad se zna da pored prirodnih inhibitora metaloproteinaza postoje i sintetski, uključujući i neke lijekove kao što su tetraciklini.

## 3. BOLESNICI I METODE ISPITIVANJA

### 3.1. Bolesnici

Svi bolesnici uključeni u istraživanje liječeni su u Klinici za infektivne bolesti (KIB) «Dr. Fran Mihaljević» u Zagrebu. U ispitivanje je ukupno uključeno 40 bolesnika muškog spola u dobi od 12 do 60 godina s atipičnom pneumonijom koju je uzrokovala mikoplazma pneumonije. Klinička dijagnoza pneumonije iz opće populacije definirana je akutnim početkom s povišenom temperaturom i rendgenskom potvrdom plućnog infiltrata. Etiološka dijagnoza bolesti potvrđena je serološkim testiranjem. Kontrolna skupina obuhvaća 20 zdravih muških ispitanika slične životne dobi. Svi ispitanici su prije uključivanja u istraživanje bili usmenim i pismenim putem obavješteni o namjeri istraživanja i potpisali su informirani pristanak. Za bolesnike mlađe od 18 godina o istraživanju su informirani roditelji koji su potpisali informirani pristanak.

Kriteriji za uključivanje u istraživanje bili su:

- Potpisan informirani pristanak
- Klinička dijagnoza pneumonije potvrđena rendgenskom slikom pluća
- Imunoenzimskim (ELISA) testom nedvojbeno dokazana *Mycoplasma pneumoniae*
- Trajanje bolesti manje od sedam dana prije hospitalizacije
- Bolesnici bez težih kroničnih bolesti i imunodeficijencije

Tijekom hospitalizacije i ambulantnog praćenja prikupljali su se i analizirali klinički i laboratorijski podaci bolesnika. Kod prijema bolesnika u bolnicu uzeti su podaci o: dobi, spolu, visini i trajanju febriliteta, tipu i intezitetu kašlja, i drugim respiratornim simptomima, glavobolji, mijalgijama i artralgijsama, te epidemiološka anamneza. Također su određivani i analizirani laboratorijski pokazatelji – sedimentacija eritrocita (SE), C-reaktivni protein (CRP), crvena i bijela krvna slika (KKS), aminotransferaze (aspartat aminotransferaza – AST, alaninaminotransferaza – ALT, gamaglutamiltransferaza  $\gamma$ GT), elektroforeza serumskih proteina, elektroliti u serumu (natrij, kalij, kloridi), te EKG. Svim bolesnicima je unutar 24 sata od prijema u bolnicu učinjena rendgenska snimka pluća. Kod otpusta bolesnika iz bolnice kontrolirani su patološki laboratorijski nalazi i rendgenska snimka pluća, a u slučaju perzistiranja patološkog nalaza ponovljeni su nakon četiri tjedna prilikom ambulantnog pregleda.

Isto tako, od bolesnika je pri hospitalizaciji, te nakon četiri tjedna uzeto 10 ml krvi koja je heparinizirana (300 i.j. heparina) za izolaciju mononukleara i 5 ml neheparinizirane krvi od koje je odvojen serum i testira na serološke i imunološke pretrage. Ista količina krvi jednokratno je uzeta od 20 zdravih muških ispitanika (zdravstveni radnici, studenti). Uzorci krvi obrađeni su u Odsjeku za celularnu imunologiju, Odjela za istraživanje i razvoj, u Imunološkom zavodu u Zagrebu i KIB „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

Osim imunoloških, učinjene pretrage tijekom hospitalizacije su dio uobičajene laboratorijske obrade bolesnika s atipičnom pneumonijom. Ispitanici iz kontrolne skupine nisu bili podvrgnuti dodatnim dijagnostičkim zahvatima.

Sve hematološke (SE, KKS), i biokemijske (CRP, AST, ALT,  $\gamma$ GT, elektroforeza serumskih proteina, natrij, kalij, kloridi) analize učinjeni su u hematološkom i biokemijskom laboratoriju KIB „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Biokemijske pretrage učinjene su standardnim enzimatskim metodama, a hematološke na automatskom brojaču ACT 8 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, SAD). Rendgensko slikanje pluća učinjeno je na Odjelu za rendgenološku i ultrazvučnu dijagnostiku KIB „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu, koristeći standardne metode snimanja (PA i profilna snimka prsnog koša).

Sve podatke o bolesnicima prikupljao je jedan istraživač. Podaci o bolesnicima prikupljeni tijekom hospitalizacije i ambulantnog praćenja upisivani su u bazu podataka u komjutorskom programu Microsoft Access.



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Serološko dijagnosticiranje pneumonija uzrokovanih mikoplazmom pneumonije

Serumi bolesnika testirani su komercijalnim kitom *Mycoplasma pneumoniae*-ELISA IgM, IgG, IgA (Savyon Diagnostic LTD, Izrael). To je semikvantitativni test koji otkriva specifična IgM, IgG i IgA protutijela. Kao antigen se koristi P-1 membranski protein. Obrađivani su parni uzorci seruma. Prvi uzorak uzet je na početku hospitalizacije, a drugi uzorak nakon dva tjedna. Kriteriji za serološku dijagnozu (ELISA- tehnikom) pneumonije koju uzrokuju *M. pneumoniae* jesu:

- serokonverzija titra protutijela
- pozitivan IgM titar protutijela u bilo kojem uzorku seruma
- dvostruki ili viši porast titra IgG protutijela u parnim uzorcima seruma
- dvostruki ili viši porast titra IgA protutijela u parnim uzorcima seruma

Istodobno serumi su testirani i na druge uzročnike atipičnih pneumonija: *Chlamydia psittaci* i *Chlamyophila pneumoniae*-IFA IgM, IgG, IgA (Savyon, Izrael); *Coxiella burnetii*-ELISA IgM, IgG (Virion, Njemačka); *Legionella pneumophila*-ELISA IgM, IgG (Virion, Njemačka).

Svi su serumi testirani u Mikrobiološkom laboratoriju KIB "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu.

### **3.2.2. Izolacija mononuklearnih stanica**

Heparinizirana krv držana je na sobnoj temperaturi do dva sata od uzimanja, a potom obrađena. Da bi se istaložili eritrociti, krv se u sterilnoj epruveti pohranjuje u inkubatoru na 37 °C tijekom 15 minuta. Kao supernatant odvojila se plazma, nadslonjila se nad otopinu Ficoll-Paque (1,13 g/ml, Pharmacia, Upsala, Švedska), u volumnom omjeru 1:1, a potom centrifugirala na 800 x g, 15 minuta. Preostali eritrociti, granulociti i mrtve stanice izdvojili su se na gradijentu gustoće na dnu epruvete, dok se na dodirnom sloju fikola i plazme izdvojio prsten sastavljen od limfocita i monocitno-makrofagnih stanica. Pasteurovom pipetom pažljivo se pokupio prsten, a dobivena suspenzija potom dva puta isprala u mediju, te istaložila centrifugiranjem na 400 x g. Nakon dekantiranja, koncentracija stanica podesila se na  $10^7$ /ml medija.

### 3.2.3. Izolacija ribonukleinske kiseline

Na  $10^6$  mononukleara doda se 0.2 ml TRIzol/RNA-Bee (Biogenesis, England). Nakon što se stanice uzastopnim pipetiranjem liziraju ostave se 5-6 minuta na sobnoj temperaturi te se doda kloroform (Kemika, Hrvatska) u omjeru 1:4 na ukupnu količinu dodanog TRIzola/RNA-Bee. Snažno se promućka 15 puta do mliječne boje i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon inkubacije uzorci se centrifugiraju na  $12\ 000 \times g$ , 15 min/4 °C. Gornja vodena faza prebaci se u svježe tubice i doda izopropanol (Kemika, Hrvatska) u omjeru 1:2 na ukupnu količinu TRIzola/RNA-Bee. Snažno se promućka pet puta i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta, nakon čega se uzorci centrifugiraju na  $12\ 000 \times g$ , 10 minuta/4 °C. Nakon što se odstrani supernatant, doda se 70% etanola (Kemika, Hrvatska) u omjeru 1:1 na ukupnu količinu TRIzola/RNA-Bee i promiješa jednu minutu. Nakon toga uzorci se centrifugiraju na  $7\ 500 \times g$ , 5 minuta/4 °C. Supernatanti se baciju, a dobivena RNK suši u evaporatoru 5-10 minuta. RNK se otopi u 20  $\mu$ l "RNaze free" vode, pasirajući tekućinu nekoliko puta u nastavku te inkubira 10 minuta na 55-60°C. Nakon inkubacije odredi se absorbancija spektrofotometrom ( $A_{260/280}$ , Eppendorf, Njemačka). RNK se spremi na -80 °C do testiranja.

### **3.2.4. Određivanje genske ekspresije kemokina i matriks metaloproteinaza kvantitativnim 'real-time' PCR-om**

Jedan  $\mu\text{g}$  ukupne RNK preveli smo reverznom transkripcijom u cDNK koristeći se enzimom AMV reverzna transkriptaza i nasumičnim početnicama (od eng. random primers). Za sintezu cDNK korišten je 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Applied Science) prema uputama proizvođača. Po završetku sinteze cDNK, reakcijsku smjesu smo razrijedili na konačni volumen od 300  $\mu\text{l}$ , te uzorak podijelili u manje alikvote i pospremili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  za daljnja testiranja.

Razinu transkripcijskog odgovora određenih kemokina (IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\beta$ ) i dvije matriks metaloproteinaze (MMP-2 i MMP-9) analizirali smo kvantitativnim 'real-time' PCR-om. Ciljne sekvence smo amplificirali koristeći LightCycler primer set (Search-LC, Heidelberg, Njemačka) sa LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kitom (Roche Applied Science) prema uputama proizvođača. Analiza genske ekspresije izvođena je na uređaju LightCycler real-time, verzija 1.2 (Roche Diagnostics). GAPDH 'housekeeping' gen korišten je za normalizaciju uzoraka radi njihovog daljnjeg uspoređivanja.

### **3.2.5. «Protein array» test**

Inicijalno smo u manjem broju uzoraka („screening“) citokine/kemokine u serumima određivali pomoću protein array tehnike (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, SAD). Koristili smo RayBio Human Inflammation Antibody Array III (Cat.No. H0128003) kit koji omogućuje testiranje 40 različitih citokina/kemokina. Protein array testiranje učinjen je prema uputama proizvođača. Kemiluminiscentna detekcija je paravljena izlaganjem membrana na rendgenski film. Razinu proteina odredili smo koristeći Kodac ID Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, SAD). Intenzitet signala normalizira se u odnosu na kontrolne signale (biotin-vezani IgG), što omogućuje usporedbu različitih membrana. Metoda je semikvantitativna.

### **3.2.6. Određivanje kemokina i matriks metaloproteinaza imunoenzimskim testom**

IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-9 određivali smo u seruma bolesnika i zdravih ispitanika koristeći ELISA kitove (Quantikine™, R&D Systems, Oxon, Velika Britanija) prema uputama proizvođača.

### **3.3. STATISTIČKA OBRADA**

U statističkoj analizi koristila se deskriptivna statistika. Vrijednosti kategorijskih varijabli prikazane su tablicama frekvencije. Vrijednosti kontinuiranih varijabli opisali smo aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom za normalno distribuirane varijable, a medijanom i interkvartalnim rasponom za varijable koje nisu normalno distribuirane. Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom nakon čega je za testiranje razlika korišten Mann-Whitneyev test budući da varijable nisu imale normalnu distribuciju (Kruskal-Wallis za više ispitivanih skupina). Povezanost kontinuiranih varijabli izražavana je Spearmanovim rangom korelacije. U radu je korišten statistički program SPSS ver 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

## 4. R E Z U L T A T I

Istražili smo moguću ulogu kemokina (IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) i metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9) u imunopatogenezi pneumonije koju uzrokuje *M. pneumoniae*. U tu svrhu analizirali smo ekspresiju gena za spomenute kemokine i metaloproteinaze u mononuklearnim stanicama periferne krvi 40 bolesnika u akutnoj fazi bolesti i u rekonvalescenciji, četiri tjedna poslije. Dobiveni rezultati testiranih gena korigirali su se u odnosu na ekspresiju kontrolnog gena – GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), odnosno korišten je omjer GAPDH i ispitivanih kemokina, odnosno metaloproteinaza. U onih bolesnika u kojih je ekspresija gena bila smanjena u odnosu na kontrolni gen – GAPDH označavana je brojem nula. Također smo u isto vrijeme istraživali koncentraciju IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-9 u perifernoj krvi naših ispitanika u akutnoj i rekonvalescentnoj fazi bolesti ELISA testom.

Kontrolnu skupinu činilo je 20 zdravih muškaraca, prosječne dobi 29 godina (15-48), koja se statistički nije razlikovala prema dobi od ispitivane skupine bolesnika. Kako se radi o neparametrijskim testovima u relativno manjem uzroku ispitanika onda smo kao statističke parametre koristili medijan i interkvartilni raspon, odnosno raspon.

Pored imunoloških parametara, analizirali smo epidemiološke, kliničke i laboratorijske nalaze u naših bolesnika.



## 4.1. Epidemiološke i kliničke osobitosti bolesnika

Osnovne epidemiološke i kliničke značajke naših bolesnika prikazani su u tablici 1. Radilo se o mladim bolesnicima, prosječne dobi od 19 godina (12-54 godina) koji su najčešće bili hospitalizirani petog dana bolesti. U većine bolesnika sedimentacija eritrocita bila je blago do umjereno ubrzana, većina je imala blago do umjereno povišene vrijednosti C-reaktivnog proteina i alfa-2 globulina, normalan broj leukocita, te blagu neutrofiliju.

Rendgenska slika pluća otkriva intersticijske plućne infiltrate jednog (28 ili 70% bolesnika) ili dva plućna režnja (12 ili 30% bolesnika). Pleuralni izljev zabilježen je u 6 ili 15% bolesnika. Većina bolesnika ili 90% liječeno je azitromicinom, a ostali doksiciklinom (2 ili 5%), odnosno ciprofloksacinom (2 ili 5%). Na primjenjenu antibiotsku terapiju polučio se vrlo dobar klinički učinak, niti jedan bolesnik tijekom hospitalizacije nije razvio komplikaciju bolesti, a otpušteni su u prvom (30%) ili drugom tjednu (70%) hospitalizacije.

**Tablica 1.** Epidemiološke i kliničke značajke 40 bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*

Epidemiološke i laboratorijske značajke bolesnika (n=40)	Medijan	Raspon (interkvartilni raspon)
Dob (godine)	19	12-54 (8)
Trajanje bolesti prije hospitalizacije (dani)	5	1-7 (4)
SE (mm/1.sat)	40	6-88 (32)
C-reaktivni protein (mg/L)	74	18-266 (82)
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )	8,9	3,9 -18,6 (4,3)
- neutrofilij (rel.%)	72	53-83 (14)
- limfociti (rel.%)	15	7-32 (10)
- monociti (rel.%)	11	3-21 (5)
Alfa-2 globulini (rel.%)	11,3	6,8-16,5 (3)

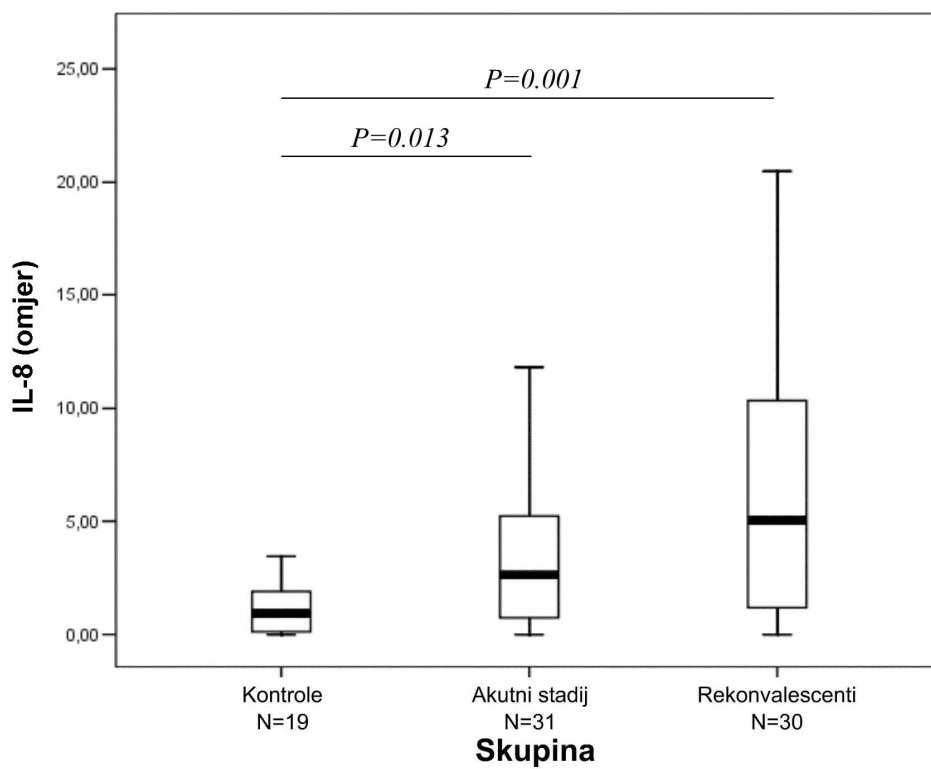
## **4.2. Analiza ekspresije gena i serumske razine IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-9**

U ovom radu analiziraju se promjene u IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-9 na razini ekspresije gena u perifernim mononuklearima, te u isto vrijeme i razina IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-9 u serumu bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*.

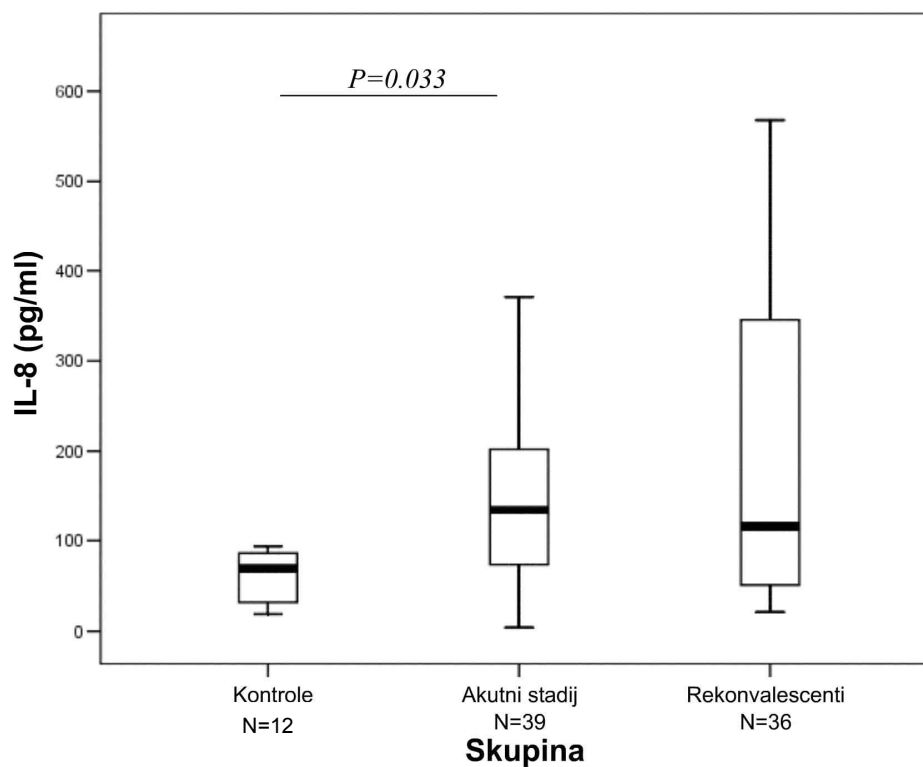
Niti u jednom od ispitivanih uzoraka bolesnika, kao niti kontrolne skupine nije se registrirala ekspresija gena za MMP-2. U 31 bolesnika s akutnom infekcijom, 30 rekonvalescenata, odnosno 19 kontrolnih ispitanika bilježi se ekspresija gena za IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  i MMP-9.

Koncentracija IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-9 u serumu učinjena je u 39 bolesnika u akutnoj fazi bolesti, 36 rekonvalescenata i 12 kontrolnih ispitanika ELISA metodom. Vrijednosti u bolesnika su analizirane u akutnoj i rekonvalescentnoj fazi i uspoređene s vrijednostima zdravih ispitanika (kontrola). U analizi su korišteni neparametrijski statistički testovi (Kruskal-Wallis, razlika značajna kod  $p < 0,05$  i Mann-Whitney, razlika značajna kod  $p < 0,05$ ).

A

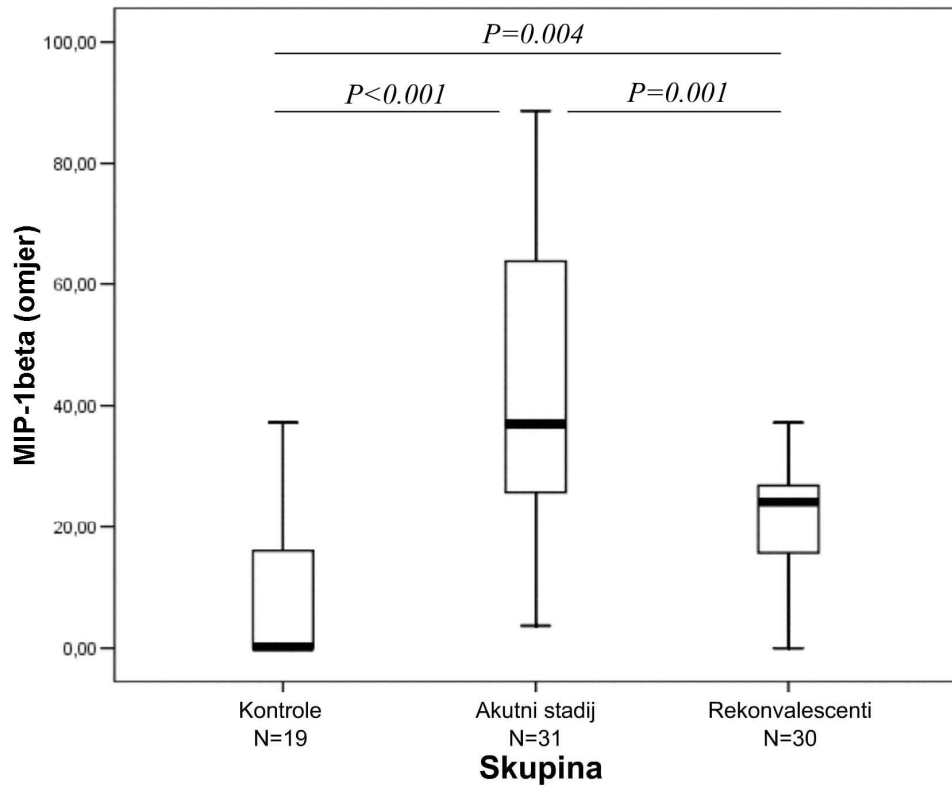


B

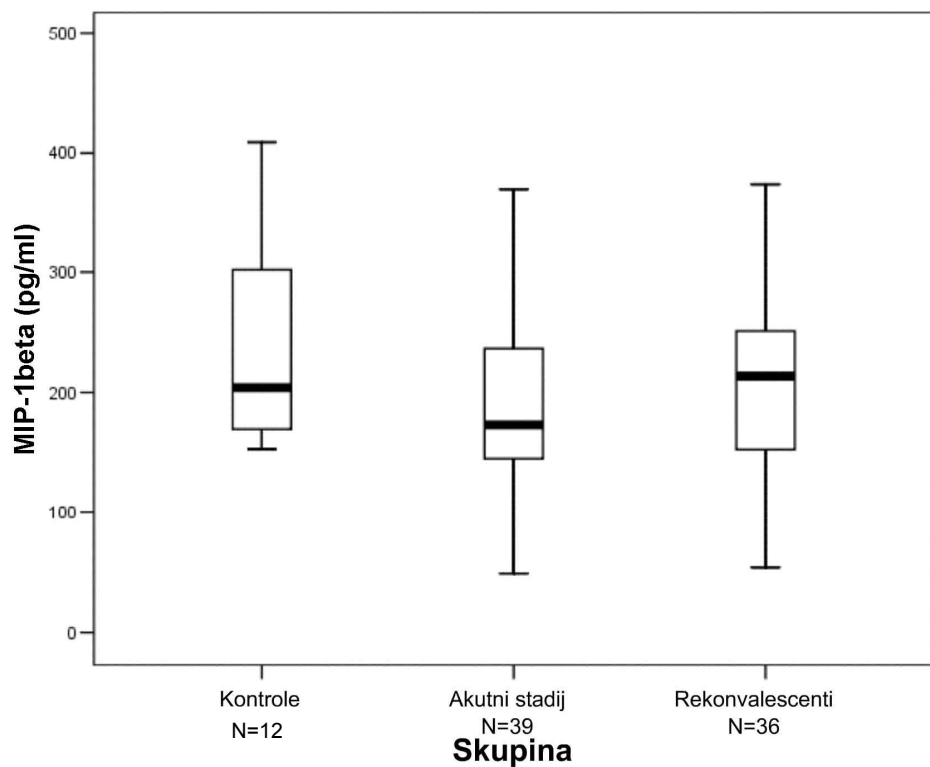


**Slika 4.** Analiza genske ekspresije interleukina-8 (IL-8) u perifernim mononuklearima (A), te razine IL-8 u serumu (B) bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*.

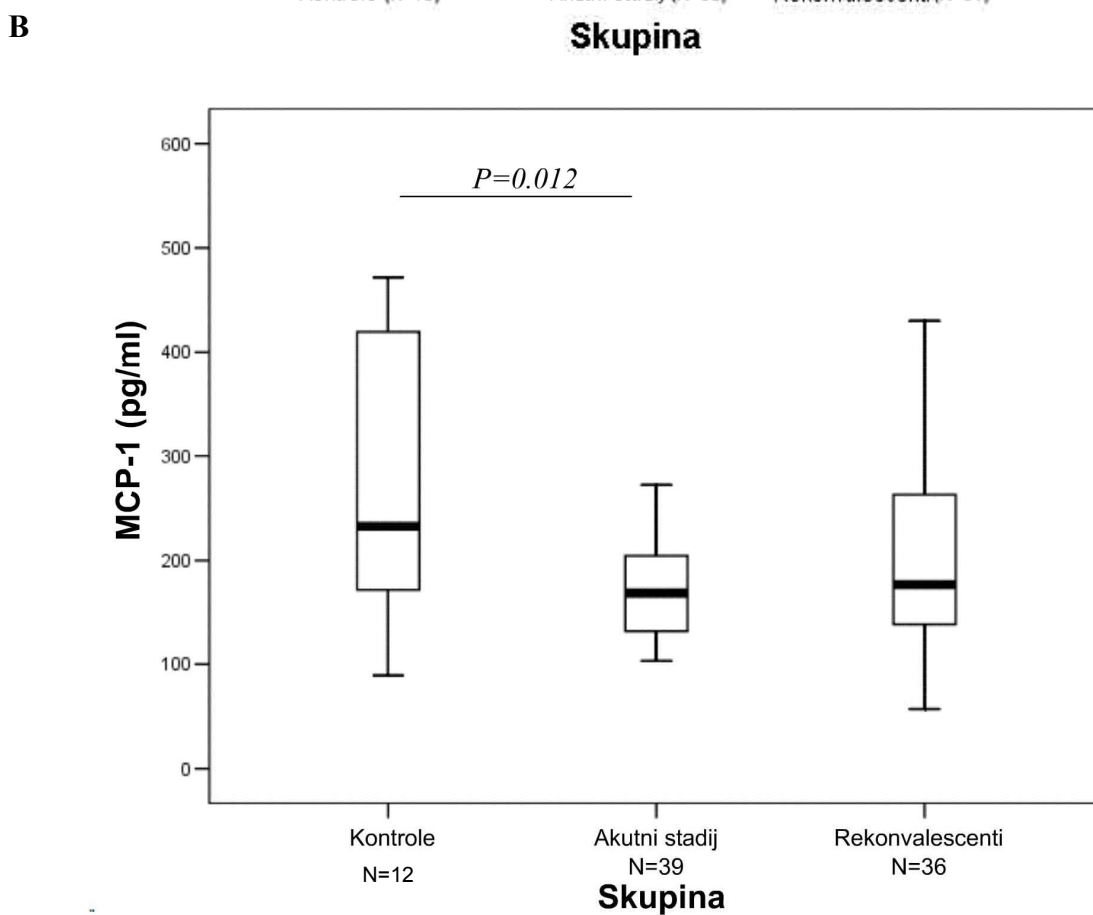
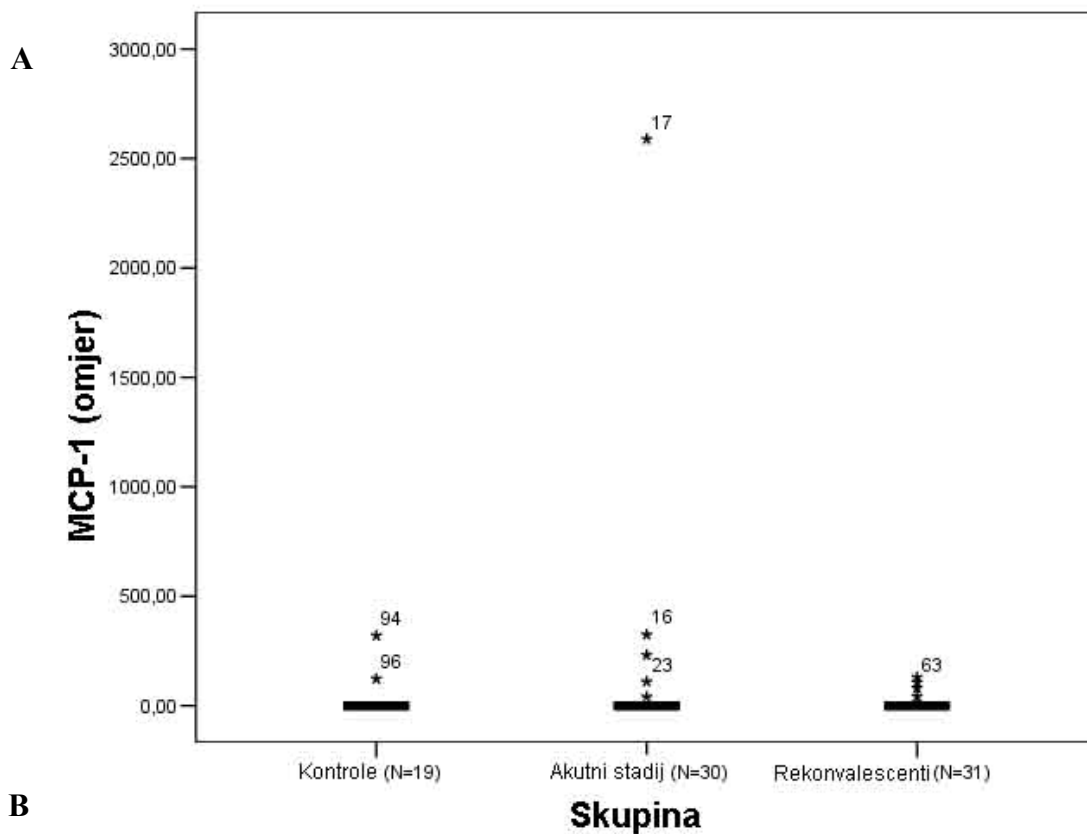
A



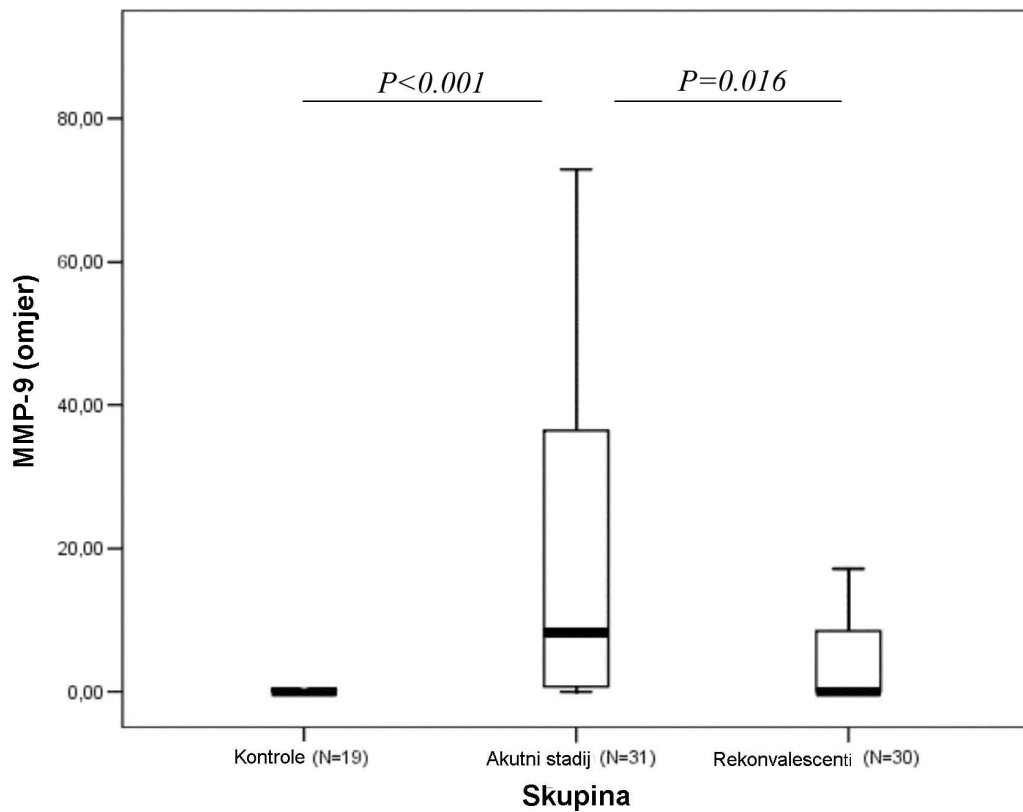
B



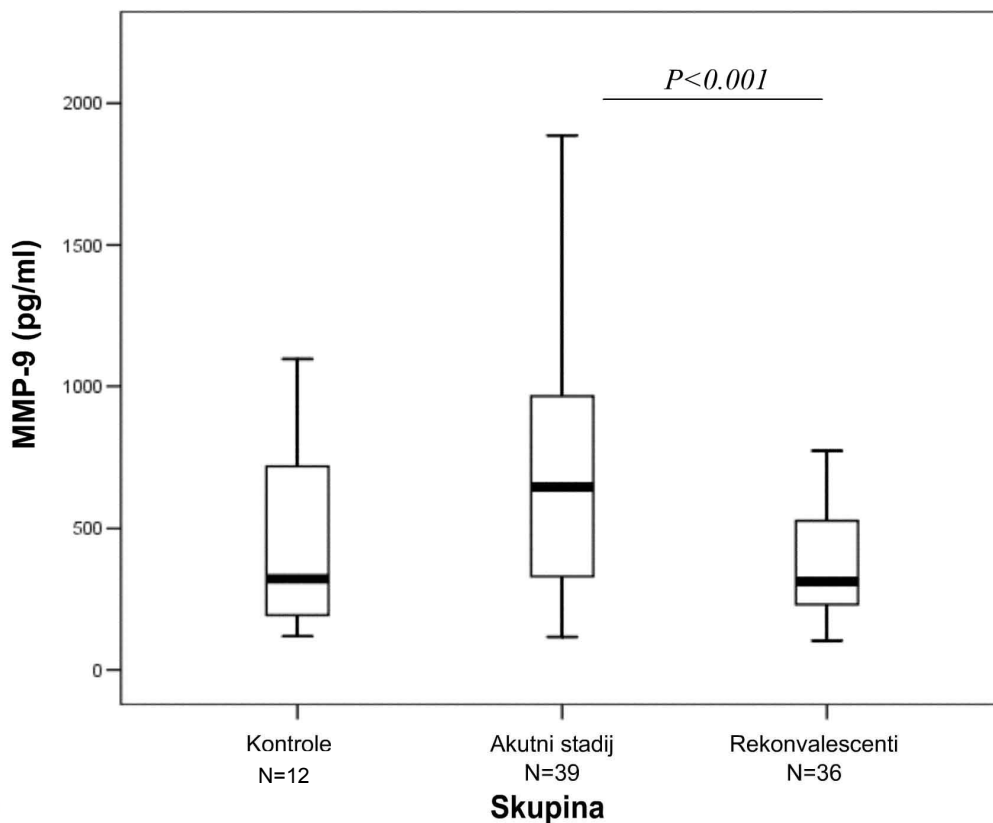
**Slika 5.** Analiza genske ekspresije upalnog proteina makrofaga 1 beta (MIP-1 $\beta$ ) u perifernim mononuklearima (A), te razine MIP-1 $\beta$  u serumu (B) bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*.



**Slika 6.** Analiza genske ekspresije kemotaksijskog proteina monocita 1 (MCP-1) u perifernim mononuklearima (A), te razine MCP-1 u serumu (B) bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*.

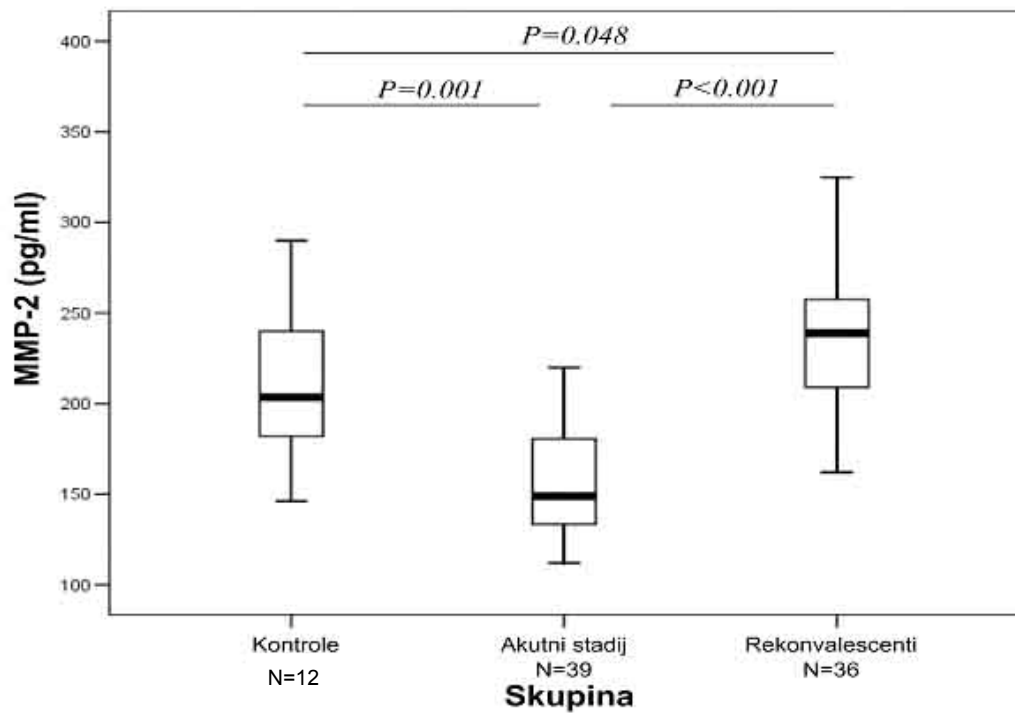


A



B

**Slika 7.** Analiza genske ekspresije metaloproteinaze-9 (MMP-9) u perifernim mononuklearima (A), te razine MMP-9 u serumu (B) bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*.



**Slika 8.** Analiza razine MMP-2 u serumu bolesnika s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae*.

U bolesnika s pneumonijom uzrokovanom *M. pneumoniae* nalazimo pojačanu gensku ekspresiju IL-8 kako u akutnoj, tako i u rekonvalescentnoj fazi (slika 4A). Štoviše, pokazuje se izvjestan dinamički porast prema rekonvalescentnoj fazi. Razlika je statistički značajna na razini sva tri uzorka (Kruskal-Wallis test;  $p=0,003$ ). Isto tako, registrira se statistički značajna razlika između bolesnika u akutnoj fazi i kontrolnih ispitanika (Mann-Whitney test;  $p=0,013$ ), te rekonvalescenata i kontrolne skupine (Mann-Whitney test;  $p=0,001$ ). Vrijednosti su statistički značajno povišene i usporedbom koncentracije IL-8 u serumu bolesnika u akutnoj fazi bolesti i kontrolne skupine (Mann-Whitney test;  $p=0,033$ ) (slika 4B). U rekonvalescenciji dolazi do blagog pada razine IL-8 u odnosu na akutnu fazu bolesti, vrijednosti su još uvijek povišene, no bez statističke značajnosti (Mann-Whitney test;  $p=0,054$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 4B). Statistička analiza razine IL-8 u serumu na razini sva tri uzorka ne bilježi statističku značajnost (Kruskal-Wallis test;  $p=0,099$ ).

Iako je ekspresija gena za MIP-1 $\beta$ , bila značajno povišena u perifernim mononuklearima, kako bolesnika u akutnoj (Mann-Whitney test;  $p<0,001$ ), tako i rekonvalescentnoj fazi (Mann-Whitney test;  $p=0,004$ ) u odnosu na zdrave ispitanike (slika 5A), nema značajnih razlika u serumskoj razini MIP-1 $\beta$  u bolesnika ni u akutnoj (Mann-Whitney test;  $p=0,162$ ), ni u rekonvalescentnoj fazi (Mann-Whitney test;  $p=0,609$ ) u odnosu na zdrave kontrole (slika 5B). Statistička analiza sva tri uzorka pokazuje također statističku značajnost na razini genske ekspresije MIP-1 $\beta$ , a razlika nije statistički značajna usporedbom serumske koncentracije MIP-1 $\beta$  (Kruskal-Wallis test;  $p<0,001$ ;  $p=0,334$ ).

Nismo zabilježili povišenje u genskoj ekspresiji MCP-1 kako u akutnoj (Mann-Whitney test;  $p=0,585$ ), tako i u rekonvalescentnoj fazi naših bolesnika (Mann-Whitney test;  $p=0,649$ ) u odnosu na kontrolne ispitanike (slika 6A). Štoviše, razina MCP-1 je bila statistički značajno snižena u akutnoj fazi bolesti u odnosu na zdrave ispitanike (Mann-Whitney test;  $p=0,012$ ), a u rekonvalescenciji dolazi do blagog porasta razine MCP-1 u serumu (slika 6B). Koncentracija MCP-1 u rekonvalescenciji je još uvijek niža nego u kontrolnoj skupini, no bez statističke značajnosti (Mann-Whitney test;  $p=0,055$ ). Statistička analiza sva tri uzorka ne pokazuje statističku značajnost na razini genske ekspresije MCP-1, no razlika je statistički značajna usporedbom serumske koncentracije MCP-1 (Kruskal-Wallis test;  $p=0,856$ ;  $p=0,039$ ).

Analizirajući gensku ekspresiju i serumsku koncentraciju MMP-9 u naših bolesnika uočava se njena uloga tijekom akutne faze bolesti, ali je njezino djelovanje kratko (slika 7A i 7B). Naime, genska ekspresija je statistički značajna pojačana u bolesnika u akutnoj fazi u



odnosu na kontrolne ispitanike, kao i na bolesnike u rekonvalescenciji (Mann-Whitney test;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,016$ ) dok razlika nije statistički značajna između rekonvalescenata i kontrolnih ispitanika (Mann-Whitney test;  $p = 0,140$ ). Koncentracija MMP-9 u akutnoj fazi je viša nego u kontrolnoj skupini, uz statističku značajnost (Mann-Whitney test;  $p < 0,001$ ) dok razlika nije statistički značajna između rekonvalescenata i kontrolnih ispitanika (Mann-Whitney test;  $p = 0,062$ ). Statistička analiza na razini sva tri uzorka registrira statistički značajnu razliku i na razini genske ekspresije MMP-9, kao i na razini koncentracije MMP-9 u serumu bolesnika (Kruskal-Wallis test;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,002$ ).

Niti u jednom od ispitivanih uzoraka mononukleara bolesnika, kao niti kontrolne skupine nije se registrirala ekspresija gena za MMP-2. Analiza serumske koncentracije MMP-2 otkriva nižu razinu MMP-2 u bolesnika u akutnoj fazi u odnosu na kontrolne ispitanike (slika 8). Razlika je statistički značajna (Mann-Whitney test;  $p = 0,001$ ). U rekonvalescenciji dolazi do porasta razine MMP-2 u serumu i vrijednosti su statističke značajno više nego u bolesnika u akutnoj fazi, kao i kontrolnih ispitanika (Mann-Whitney test;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,048$ ). Isto tako, statistička analiza na razini sva tri uzorka registrira statistički značajnu razliku unutar skupina (Kruskal-Wallis test;  $p < 0,001$ ).

### 4.3. Korelacija interleukina -8 (IL-8), upalnog proteina makrofaga-1 beta (MIP-1 $\beta$ ) i metaloproteinaze-9 (MMP-9) s laboratorijskim nalazima i težinom bolesti

Analizirali smo međusobnu povezanost imunoloških parametara koji su bili statistički značajno povišeni u naših bolesnika, bilo na razini genske ekspresije (IL-8, MIP-1 $\beta$  i MMP-9), bilo na razini serumske koncentracije (IL-9 i MMP-9) s reaktantima akutne faze upale (sedimentacija eritrocita, C-reaktivni protein, leukociti i neutrofili).

Tako se analizom povezanosti između sedimentacije eritrocita, C-reaktivnog proteina, leukocita, neutrofila s jedne strane, odnosno ekspresije gena za IL-8 i MMP-9 s druge strane Spearmanovim testom korelacije ne nađe statistički značajna korelacija (tablica 2). Također se ne nađe statistički značajna korelacija između sedimentacije eritrocita, C-reaktivnog proteina, i neutrofila s jedne strane, odnosno genske ekspresije MIP-1 $\beta$  s druge strane. No, nađe se statistički značajna korelacija između genske ekspresije MIP-1 $\beta$  i broja neutrofila u serumu bolesnika ( $r=0,40$ ;  $p=0,025$ ).

**Tablica 2.** Povezanost ekspresije gena za interleukin-8 (IL-8), upalni protein makrofaga-1 beta (MIP-1 $\beta$ ) i metaloproteinazu-9 (MMP-9) sa sedimentacijom eritrocita, C-reaktivnim proteinoma, leukocitima i neutrofilima

Pokazatelj		SE (mmHg/1h)	CRP (mg/L)	L ( $\times 10^9/L$ )	neutrofili (rel.%)
IL-8	r	0,15	0,02	0,01	-0,05
	p	0,435	0,923	0,948	0,808
MIP-1 $\beta$	r	0,12	0,10	0,27	0,40
	p	0,510	0,589	0,148	0,025
MMP-9	r	-0,17	0,00	0,16	0,07
	p	0,415	0,989	0,455	0,759

Statistički značajna povezanost na temelju Spearmanovog testa korelacije

r – koeficijent korelacije

p – statistička značajnost

SE – sedimentacija eritrocita

L – leukociti

CRP – C-reaktivni protein

IL-8 interleukin 8

MIP-1 $\beta$  – makrofagni upalni čimbenik 1 beta

MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9

Analizirajući međusobnu povezanost osnovnih laboratorijskih nalaza i koncentracije IL-8 i MMP-9 u serumu bolesnika Spearmanovim testom korelacije ne nađe se statistički značajna povezanost između između sedimentacije eritrocita, C-reaktivnog proteina, leukocita, neutrofila s jedne strane, odnosno MMP-9 s druge strane (tablica 3). Isto tako, ne nađe se statistički značajna povezanost između između sedimentacije eritrocita, C-reaktivnog proteina i neutrofila s jedne strane, odnosno IL-8 s druge strane. No, otkriva se statistički značajna korelacija između serumske razine IL-8 i broja leukocita u perifernoj cirkulaciji bolesnika ( $r=0,36$ ;  $p=0,026$ ).

**Tablica 3.** Povezanost koncentracije u serumu interleukin-8 (IL-8) i metaloproteinazu-9 (MMP-9) sa sedimentacijom eritrocita, C-reaktivnim proteinoma, leukocitima i neutrofilima

Pokazatelj		SE (mmHg/1h)	CRP (mg/L)	L ( $\times 10^9/L$ )	neutrofilima (rel.%)
IL-8	r	0,17	0,09	0,12	0,13
	p	0,301	0,582	0,475	0,425
MMP-9	r	0,29	-0,01	0,36	0,22
	p	0,415	0,989	0,455	0,759

Statistički značajna povezanost na temelju Spearmanovog testa korelacije

r – koeficijent korelacije

p – statistička značajnost

SE – sedimentacija eritrocita

L – leukociti

CRP – C-reaktivni protein

IL-8 interleukin 8

MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9

Učinjenom analizom ne nađe se statistički značajna razlika u koncentraciji IL-8 i MMP-9 u bolesnika koji su imali pleuralni izljev u odnosu na bolesnike bez izljeva (Mann-Whitney test;  $p=0,613$ ;  $p=0,726$ ). Također, nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji IL-8 i MMP-9 između bolesnika koji su imali zahvaćena dva ili više plućnih režnjeva u odnosu na one sa zahvaćenih jednim plućnim režnjem (Mann-Whitney test;  $p=0,228$ ;  $p=0,403$ )

## 5. R A S P R A V A

U Klinici za infektivne bolesti «Dr. Fran Mihaljević» u Zagrebu broj bolesnika s pneumonijom iznosi između 700-800, odnosno 10% od ukupnog broja hospitaliziranih. Serološkom obradom tih bolesnika utvrđeno da je *M. pneumoniae* u pravilu najčešći uzročnik atipičnih pneumonija u naših hospitaliziranih bolesnika. Unatoč njenom otkriću pred više od 40 godina i napretku u razjašnjenju patogenetskih i imunoloških mehanizama postoji još dosta nepoznanica u imunopatogenetskim mehanizmima mikoplazmatske infekcije. U naše istraživanje uključena je jedna selekcionirana skupina bolesnika koji su zbog težine bolesti zahtijevali bolničko liječenje. Prema tome, nije zastupljen cijeli spektar mogućih respiratornih infekcija, niti izvanplućne manifestacije bolesti izazvane ovim uzročnikom, nego samo pojedini oblici pneumonija. Rezultati stoga ne mogu poslužiti za cjelovitiji klinički i epidemiološki uvid o infekcijama koju uzrokuje *M. pneumoniae* u našoj populaciji. Prosječna životna dob naših bolesnika bila je 19 godina, a raspon od 12-54 godina. Bolesnici su hospitalizirani najčešće petog dana bolesti. Klinička slika u naših bolesnika je bila blaga do srednje teška, što odgovara laboratorijskim nalazima kod prijema. Naime, bolesnici su imali blago do umjereno ubrzanu sedimentaciju eritrocita (medijan 40 mm/1.sat, raspon 6-88), najčešće blago povišene vrijednosti C-reaktivnog proteina (medijan 74 mg/L, raspon 18-266) i alfa-2 globulina (11,3% rel, raspon 6,8-16,5), normalan broj leukocita (medijan 8,9x10<sup>9</sup>/L, raspon 3,9-18,6), te blagu neutrofiliju (medijan 72% rel., raspon 53-83). Rendgenska snimka pluća registrira intersticijske upalne infiltrate u jednom (28 ili 70%), odnosno više režnjeva (12 ili 30%), a pleuralni izljev se bolježi u 6 ili 15% bolesnika. Na primjenjenu antibiotsku terapiju u svih bolesnika polučio se vrlo dobar klinički učinak. Tijekom hospitalizacije nisu zabilježene ozbiljnije komplikacije bolesti tako da su svi bolesnici otpušteni kući u prvom ili drugom tjednu bolničkog liječenja kao izliječeni ili poboljšani.

Dugo vremena se smatralo da je pneumonija koju uzrokuje *M. pneumoniae* blaga i samoograničavajuća. No, u nekim slučajevima *M. pneumoniae* može uzrokovati tešku i fatalnu pneumoniju, nazvanu fulminantna pneumonija.<sup>61</sup> Varijacije u imunološkom odgovoru domaćina, kao i bakterijski soj su odgovorni za različitu prezentaciju bolesti za vrijeme infekcije uzrokovane *M. pneumoniae*. U većini slučajeva fatalnih mikoplazmatskih infekcija otkrivena je imunološka abnormalnost. Međutim, neki autori opisuju preosjetljivost na mikoplazmu kao uzrokom teške pneumonije. Tako Hayashi i sur. nalaze da se CD4 T-

limfociti koji na sebe vežu HLA II pozitivne stanice akumuliraju u plućima i aktiviraju reakciju protutijela na antigen mikoplazme.<sup>26</sup>

Adherencija *M. pneumoniae* na epitelne stanice dišnog sustava je neophodna prva stepenica u kolonizaciji tkiva koja prethodi nastanku bolesti. Iako je adherencija bitna za pokretanje imunološkog odgovora domaćina na infekciju mikoplazmom, potrebni su i još neki drugi mehanizmi. Primarno mjesto *M. pneumoniae* infekcije je cilijarni epitel dišnog sustava koji je prisutan i u velikim i malim dišnim putovima. Epitel dišnog sustava je značajna strukturna i funkcionalna granica između okoliša i imunološkog sustava pluća. Kada mikoplazma dođe u donji dio dišnog sustava može biti opsonirana kompleментом ili protutijelima. Pri tom dolazi do aktivacije makrofaga koji migriraju na mjesto infekcije i započinju fagocitozu. Uz to, visok postotak neutrofila i limfocita je prisutan u alveolarnoj tekućini. CD4 T-limfociti, B-limfociti i plazma stanice infiltriraju pluća što se rendgenski manifestira infiltratom na plućima. Nakon toga slijedi intenziviranje imunološkog odgovora povezano s proliferacijom limfocita, produkcijom imunoglobulina i oslobađanjem različitih citokina i kemokina. Poznato je da mikoplazma nema stanični zid, tako ni LPS, pa lipoproteini umjesto LPS posjeduju upalne aktivnosti.

Imunološki odgovor dišnog sustava je značajan u prevenciji i patogenezi mikoplazmatske infekcije. Mikoplazma inficira gornji dio dišnog sustava prije diseminacije u donji dio dišnog sustava. Potvrđeno je da je gornji dio dišnog sustava inicijalno i glavno mjesto produkcije protutijela nakon mikoplazmatske infekcije.<sup>190</sup> To upućuje na to da bi poticanje imunosti protiv gornjeg dijela dišnog sustava smanjilo mogućnost za nastanak infekcije donjeg dijela dišnog sustava. U jednom istraživanju imunizacija nazalnim putem dovodi do produkcije mukoznih protutijela IgA klase koja štite i gornji i donji dio dišnog sustava.<sup>191</sup> No, osim lokalnih IgA protutijela za zaštitu gornjeg dijela dišnog sustava potrebni su i još neki drugi mehanizmi mukozne imunosti.<sup>190</sup> Prilikom sistemske imunizacije imunološki sustav gornjeg dijela dišnog sustava odvojen je od sistemskog. Tako sistemska imunost, iako štiti organizam od infekcije pluća pruža malu zaštitu protiv infekcije gornjeg dijela dišnog sustava.<sup>192</sup> To ukazuje na razliku u imunološkim mehanizmima gornjeg i donjeg dijela dišnog sustava.

U donjem dijelu dišnog sustava mikoplazma najprije dolaze u interakciju s epitelnim stanicama koji odgovaraju produkcijom različitih upalnih medijatora koji onda integriraju i lokalni i periferni imunološki sustav da izazovu odgovarajući odgovor. Poznato je *in vitro* da *M. pneumoniae* adherira na epitelne stanice i velikih i malih dišnih putova, no epitelne stanice mogu izazvati različit imunološki odgovor vjerojatno zbog različitih intrinzičkih svojstava na egzogene podražaje. Kompleksna mreža interakcija između mikoplazme i imunološkog

sustava domaćina podrazumijeva specifične i nespecifične imunološke reakcije koje inducira mikoplazma. Specifična imunološka obrana uključuje produkciju sistemskih i lokalnih protutijela različitih klasa i stimulaciju staničnog imunološkog sustava. Pored toga mikoplazma posjeduje široke nespecifične imunomodulatorne učinke koji utječu na imunološki sustav. Tako mikoplazme mogu izazvati supresiju ili poliklonsku stimulaciju B i T-limfocita, indukciju citokina, povećati citotoksičnost makrofaga, NK stanica i T-limfocita, pojačati ekspresiju staničnih receptora i aktivirati sustav komplementa.<sup>174</sup> Imunomodulatorski učinak mikoplazmi na imunološki sustav pridonosi njenim patogenim svojstvima. Novi domet u istraživanju mikoplazmatske infekcije je njena unutarstanična lokalizacija u domaćinu, te izazivanje infekcije izvan dišnog sustava. Postoje potvrde o tome da mikoplazma može preživjeti u različitim tipovima stanica i time izbjegnuti imunološki sustav domaćina.<sup>22,190</sup> Ona na taj način može izbjeći ili suprimirati obrambene mehanizme domaćina i stvoriti pretpostavke za kroničnu, odnosno perzistentnu infekciju. Smatra se da malena veličina genoma mikoplazme omogućuje njeno unutarstanično egzistiranje i parazitiranje na domaćinu. Ako se potvrdi postojanje i intracelularne infekcije *M. pneumoniae*, to će biti i odgovor na njenu sposobnost da izaziva izvanplućne infekcije.

Učinak mikoplazme na imunološki sustav također pridonosi patogenezi bolesti. Naime, mikoplazmatska infekcija dovodi do trigeriranja intenzivne lokalne upale, oslobađanja solubilnih medijatora koji privlače i aktiviraju druge upalne stanice. Citokini i kemokini su uključeni u normalnu regulaciju svih fizioloških procesa. Oni su molekularni signali za komunikaciju između stanica imunološkog sustava i sistemskih medijatora ili odgovora domaćina na infekciju. Upadljiva je njihova uloga u reguliranju i moduliranju imunoloških i upalnih procesa. Pluća su osobito dobro regulirana imunološkim i upalnim procesima jer su izložena brojnim infektivnim uzročnicima, kao i različitim toksičnim plinovima. Pluća se brane od tih štetnih agenasa razvijanjem obrambenih mehanizama koji su regulirani citokinima. Citokini i kemokini u plućima jasno reguliraju početak i održavanje imunološkog i upalnog odgovora. Oni selekcioniraju koji tip odgovora će biti generiran, kao i neposredne izvršioce tih radnji. Citokini i kemokini su unutarstanična grupa koja omogućuje upoznavanje stanične mreže s tri glavne funkcije – oni kontrolu stanica održavaju podjelom agenasa u svijet opasnih i svijet bezopasnih; stanica mora odrediti da li odgovoriti ili ignorirati taj agens; te mora regulirati privlačenje i aktivaciju stanica.<sup>194</sup>

Istraživanja na životinjskim modelima i čovjeku ukazuju da je u obrani domaćina od mikoplazme najvažniji urođeni imunitet povezan s alveolarnim makrofagima i humoralna imunost, a stanična imunost ima manji značaj.<sup>193</sup> Naime, u bolesnika s T-staničnom

deficijencijom pneumonija uzrokovana *M. pneumoniae* nije bila teška. Isto tako, nakon intranazalne infekcije *M. pulmonis* miševi s T-staničnom deficijencijom nisu bili osjetljiviji na infekciju nego imunokompetentni. No, stanična imunost igra bitnu ulogu u sprječavanju egzacerbacije bolesti. Bolesnici s humoralnom imunodeficijencijom isto tako nisu imali težu pneumoniju u akutnoj fazi. Međutim, oni mogu razviti kroničnu pneumoniju i diseminiranu infekciju, poglavito artritis. Zaključno, urođeni imunološki sustav igra važnu ulogu u obrani pluća od mikoplazme, humoralna imunost u obrani od sistemskog širenja infekcije, a stanična imunost u egzacerbaciji plućne bolesti.

Mi smo u našem istraživanju najprije učinili preliminarni „protein array“ test koje nam je između 40 testiranih citokina/kemokina ukazivao na pojačanu ekspresiju gena za IL-8, MCP-1 i MIP-1 $\beta$ . Stoga smo se odlučili ispitati ulogu spomenutih kemokina u imunopatogetskim mehanizmima mikoplazmatske pneumonije, iako je bilo kontradikornih izvješća o ulozi spomenutih kemokina. Uzorke RNK iz mononuklearnih stanica bolesnika analizirali smo do sedmog dana nakon infekcije te smo dobivene rezultate usporedili s ekspresijom gena u rekonvalescenciji, četiri tjedna poslije, odnosno sa zdravom kontrolnom skupinom. U našem istraživanju, u odnosu na kontrolne ispitanike, bilježi se pojačana ekspresija gena za IL-8 u akutnom stadiju bolesti ( $p=0,013$ ), a u rekonvalescenciji ekspresija je bila još više pojačana nego u akutnom stadiju, uz statističku značajnost u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,001$ ). S druge strane, nema bitne razlike u ekspresiji gena za IL-8 akutnih bolesnika i rekonvalescenta ( $p=0,220$ ). Analiza periferne krvi otkriva povećanu koncentraciju IL-8 u bolesnika u akutnoj fazi u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,033$ ). Razina IL-8 u rekonvalescentnoj fazi se postupno vraća na niže vrijednosti, i dalje je viša nego u kontrolnih ispitanika, no bez statističke značajnosti ( $p=0,054$ ). Naši rezultati upućuju na to da periferni mononukleari predstavljaju značajan izvor IL-8 tijekom pneumonije uzrokovane *M. pneumoniae*, koji onda djelovati na aktivaciju endotelnih stanica i migraciju upalnih stanica u cirkulaciji prema mjestu oštećenja/upale. Dio IL-8 izmjerene u cirkulaciji naših bolesnika dakako mogu proizvoditi i same endotelne stanice. Spearmanovim testom korelacije ne nađe se statistička povezanost između ekspresije gena za IL-8, kao i koncentracije IL-8 u perifernoj krvi s jedne strane, u odnosu na sedimentaciju eritrocita, broj leukocita i neutrofila, te koncentraciju CRP-a, s druge strane. Isto tako, nije registrirana statistička povezanost ekspresije gena za IL-8, odnosno razine IL-8 u krvi u bolesnika koji imaju pleuralni izljev, kao niti onih bolesnika koji imaju infiltrate u dva ili više plućnih režnjeva.

Broaders i sur. ne nalazi se razlika u ekspresiji gena proupalnih citokina/kemokina, kao niti njihovom oslobađanju iz humanih mononuklearnih stanica između različitih podtipova *M.*

*pneumoniae*.<sup>195</sup> Indukcijom ekspresije proinflamatornih citokina/kemokina u kulturi humanih epitelnih stanica tijekom infekcije *M. pneumoniae* registrira se pojačana produkcija IL-1 $\beta$ , IL-8 i TNF- $\alpha$  mRNA, dok se razina IL-6 i IFN- $\gamma$  mRNA ne mijenja ili je nedetektabilna. Koncentracija IL-8 ostaje visoka tijekom prvih 24 sata infekcije nakon čega njegova razina postupno pada. Chmura i sur. su istraživali signalne i transkripcijske mehanizme putem kojih *M. pneumoniae* inducira ekspresiju IL-8 u humanim epitelnim stanicama. Došli su do saznanja da je aktivacija transkripcijskih elemenata AP-1 (od engl. activator factor-1), NF-IL6 (od engl. nuclear factor-IL6) i osobito Nf $\kappa$ B (od engl. nuclear factor kapa B1) neophodna za optimalnu produkciju IL-8 u membrani epitelnih stanica dišnog sustava.<sup>196</sup>

U jednom istraživanju analiza uzorka periferne krvi u čovjeka pokazuje višu koncentraciju IL-8 u venoznoj, nego u arterijskoj krvi, te venska krv bolje reflektira upalni odgovor koji generira pneumonija.<sup>197</sup> U ranoj fazi mikoplazmatske infekcije dolazi do oslobađanja solubilnih medijatora koji privlače i aktiviraju druge upalne stanice na mjestu upale. Dokazano je da *M. pneumoniae* u kasnijoj fazi infekcije inducira produkciju citokine/kemokina u humanim mononuklearnim stanicama periferne krvi, poglavito IL-8.<sup>170</sup> Jedan od značajki upale je ekstravazacija neutrofila na mjesto upale što olakšavaju lokalni čimbenici kemotaksije. IL-8 igra važnu ulogu i snažno privlači i aktivira neutrofile, monocite i T-limfocite.<sup>27</sup> Stoga se smatra da je IL-8 najvažniji čimbenik koji pridonosi ulasku neutrofila tijekom bakterijske pneumonije. Iako ga izlučuju makrofagi i endotelne stanice, potvrđeno je da ga secerniraju i epitelne stanice dišnog sustava što ukazuje na specifični stanični, odnosno tkivni odgovor na *M. pneumoniae* infekciju.<sup>170</sup> Yang i sur. su dokazali da je tijekom *M. pneumoniae* infekcije u epitelnim stanicama dolazi do povećane ekspresije IL-8, kao i njegove produkcije.<sup>27</sup> U bolesnika s pleuralnim izljevom i fibroznim promjenama pluća u tijeku mikoplazmatske infekcije potvrđena je pojačana ekspresija IL-8.<sup>186</sup> No, Kazachkov i sur. su registrirali da epitelne stanice u nosu ne oslobađaju povišene koncentracije IL-8 i RANTES-a nakon infekcije *M. pneumoniae*.<sup>171</sup> S druge strane, ista skupina autora utvrdila je da mononuklearne stanice periferne krvi u zdravih osoba inficiranih mikoplazmom oslobađaju značajnu koncentraciju IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$ .

Narita i sur. su istraživali ulogu IL-8 i TGF- $\beta$ 1 (od engl. transforming growth factor  $\beta$ 1) u djece s pneumonijom koju uzrokuje *M. pneumoniae* u tijeku koje se razvio pleuralni izljev.<sup>186</sup> Uzimali su spomenute kemokine sekvencijski u uzorcima seruma svakih 4 do 7 dana, te u pleuralnom izljevu. U uzorcima seruma 11 djece (1-15 godina) s mikoplazmatskom infekcijom nisu nađene povišene vrijednosti IL-8 iako su neka djeca uz pneumoniju imala i encefalitis. To ukazuje da IL-8 u sistemske cirkulaciji ne igra bitnu ulogu u patogenezi



infekcije koju uzrokuje *M. pneumoniae*, odnosno sistemski i lokalni imunološki odgovor se međusobno razlikuju. U uzorcima pleuralnog izljeva IL-8 je bio registriran u 9 od 11 uzoraka, a najviša razina je bila u djece s fibroznim promjenama koje su se mogle otkriti na rendgenskoj snimci pluća duže od četiri tjedna. TGF- $\beta$ 1 je također bio otkriven u pleuralnoj tekućini, no razina nije bila u korelaciji s promjenama na plućima i bila je niža nego u serumu. Naime, IL-8 se specifično može producirati u plućima i igrati važnu ulogu u patomehanizmu trajnih fibroznih promjena u plućima i posljedično intraluminalnoj organizaciji.<sup>186</sup> Patološke promjene pneumonije koju uzrokuje *M. pneumoniae* su karakterizirane infiltracijom mononuklearnih stanica na mjesto upale. Rollins i sur. su otkrili da se infiltracija bronhiola sastoji uglavnom od plazma stanica i limfocita dok se u alevolama nalaze pretežno polimorfonuklearni leukociti.<sup>198</sup> Uloga IL-8, neutrofilnog kemokina, je osobito interesantna u tijeku mikoplazmatske pneumonije obzirom da na mjestu upale dominira infiltracija mononuklearima, iako se registriraju i polimorfonuklearni leukociti u BAL-u i intraalveolarnom eksudatu tijekom infekcije. To nam jasno sugerira da je IL-8 uključen u patomehanizme pneumonije uzrokovane *M. pneumoniae*.

Ekspresija gena za MCP-1 bila je snižena u većine naših bolesnika u akutnoj fazi bolesti, kao i u rekonvalescenciji. Sličan rezultat ekspresije je zabilježen o kontrolnih ispitanika. Koncentracija MCP-1 u perifernoj krvi je značajno viša u kontrolnoj skupini nego u akutnoj stadiju bolesti dok u rekonvalescenciji postupno raste razina MCP-1.

Ekspresija gena za MIP-1 $\beta$  bila je značajno povećana u akutnih bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu. U rekonvalescenciji dolazi do postupnog smanjenja ekspresije, no vrijednosti su još uvijek statistički značajno više nego u kontrolnih ispitanika. Koncentracija MIP-1 $\beta$  se bitno ne razlikuje između ispitivanih bolesnika u akutnoj fazi bolesti i rekonvalescenciji, odnosno kontrolne skupine. Spearmanovim test korelacije nalazi se statistički značajna korelacija između genske ekspresije MIP-1 $\beta$  na mononuklearnim stanicama s jedne strane i postotka neutrofila u serumu bolesnika s druge strane.

MCP-1, poznato je da uz još neke kemokine igra važnu ulogu u transportu monocita u alveole tijekom pneumonije.<sup>169</sup> Jedan od važnih proizvođača MCP-1 su endotelne stanice, a MCP-1 snažno kemotaksijski djeluje na migraciju monocita/makrofaga, memorijskih T-stanica i dendritičkih stanica.<sup>122</sup> Do sada nisu opisana istraživanja o ulozi MCP-1 i MIP-1 $\beta$  u pneumoniji koju uzrokuje *M. pneumoniae* u čovjeka. Postoji tek nekoliko studija na miševa koja govore mogućoj ulozi tih kemokina u patogenezi mikoplazmatske infekcije. Hardy i sur. nalaze povišene vrijednosti MCP-1 u BAL-u miševa nakon eksperimentalne infekcije *M. pneumoniae*.<sup>175</sup> Rios i sur. otkrivaju povišene koncentracije IL-8 i MCP-1, uz još neke druge

kemokine, u BAL-u BALB miševa nakon eksperimentalne *M. pneumoniae* infekcije.<sup>198</sup> U miševa koji su bili tretirani cethromycinom koncentracija kemokina je bila značajno snižena od četvrtog dana terapije. U radu Jonesa i sur. opisuje se pojačana ekspresija MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, ali ne i RANTES-a u miševa inficiranim *M. pulmonis*.<sup>199</sup> Analizirajući naše dobivene rezultate razine MCP-1 u naših bolesnika, potrebni bi bili dodatni *in vitro* i *ex vivo* pokusi da bi se shvatilo, radi li se o smanjenju produkcije kao rezultatu mehanizama obrane organizma od migracije zaražnih stanica ili samog imunomodulatornog djelovanja mikoplazmi. S druge strane, ostaje upitno na kojoj je razini došlo do pojačane ekspresije MIP-1 $\beta$ . Moguća je autokrina uloga MIP-1 $\beta$  na monocitno/makrofagnu komponentu u perifernim mononuklearima. Poznato je MIP-1 $\beta$  produciraju brojne vrste stanice, poglavito makrofagi i limfociti, a njegova bita uloga je kemotaksija T-limfocita iz cirkulacije na mjesto upale. Pozitivna korelacija s postotkom neutrofila u perifernoj krvi sugerira najvjerojatniju ulogu u privlačenju mononuklearnih stanica u pluća i smanjenju njihova broja u perifernoj cirkulaciji i time povećanju udjela neutrofila u ukupnom broju leukocita.

Pneumonija je karakterizirana masivnim ulaskom neutrofila na mjesto upale koji dovode do oštećenja tkiva pluća. U tim procesima MMP oslobođenje iz neutrofila igraju značajnu ulogu. U fiziološkim uvjetima leukociti se nalaze u vaskularnom sustavu pluća. Tijekom pneumonije oni ulaze u alveolarne prostore i izlučuju različite enzime koji su pothranjeni u granulama i vezikulama, uključujući i MMP.<sup>200</sup> Oslobođenje MMP mogu olakšati migraciju neutrofila i limfocita u alveolarne prostore gdje pored njih i neki sastojci leukocitnih granula i reaktivni kisikovi radikali mogu pokazati svoju antimikrobijalnu funkciju. Gelatinaze (MMP-2, MMP-9) su od osobitog značaja u upalnim bolestima pluća zbog njihovog djelovanja na pojedine komponente bazalne membrane koja onda diktira migraciju različitih populacija limfocita, kao što su T-limfociti i neutrofili.<sup>201</sup> Potvrđeno da neutrofili izlučuju uglavnom MMP-8 i MMP-9, te razina tih MMP-a kolerira s težinom kliničke i postotkom neutrofila u BAL-u bolesnika s pneumonijom (Hartog). Uz to izvor MMP-9 u dišnim putovima mogu biti magrofagi, eozinofili, a neki autori navode da su i T-limfociti značajan izvor MMP-9.<sup>202</sup>

Analizirajući ekspresiju gena u naših ispitanika nije se u nijednom uzorku registrirala ekspresija gena za MMP-2. Mala je vjerojatnost da radi o lažno negativnim rezultatima budući da se radilo precizno po uputama proizvođača, a koji su uz to nakon prvih negativnih rezultata i usmeno konzultirani. Stoga možemo zaključiti da tijekom upale pluća uzrokovane *M. pneumoniae* ne dolazi do ekspresije gena za MMP-2. Isto tako, analiza koncentracije MMP-2 u serumu mjerene ELISA metodom otkriva njene niže vrijednosti u bolesnika u akutnoj fazi u odnosu na kontrolnu skupinu. U rekonvalescenciji dolazi do postupnog porasta razine MMP-2

i dostiže vrijednosti više nego u kontrolnoj skupini, no bez statističke značajnosti. S druge strane, bilježi se pojačana ekspresija MMP-9 u bolesnika u akutnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu uz statističku značajnost. U rekonvalescenciji dolazi do smanjenja ekspresije MMP-9 tako da se ne razlikuje od kontrolnih ispitanika. Koncentracija MMP-9 mjerene ELISA metodom u serumu akutnih bolesnika viša je u odnosu na kontrolnu skupinu, a u rekonvalescenciji dolazi do pada razine MMP-9, no ona je još uvijek viša nego u kontrolnih ispitanika. Naši rezultati jasno pokazuju da MMP-9 ima ulogu tijekom akutne faze bolesti u naših bolesnika, ali i da je njezino djelovanje relativno kratko. Iako su po strukturi MMP i MMP-9 vrlo slične, te u nekim procesima djeluju sinergistički, u naših bolesnika smo našli značajno snižene serumske razine MMP-2 u akutnoj fazi bolesti, slično kao i kod vrijednosti MCP-1. To sniženje je također kratko trajalo u akutnoj fazi bolesti, da bi se u fazi rekonvalescencije vratilo na razinu MMP-2 izmjerenu u zdravih kontrola. Različite molekule (npr. trombin) mogu utjecati na sniženje razine MMP-2. Daljnja istraživanja su potrebna da bi se potvrdilo koji su mehanizmi sniženja vrijednosti MMP-2 u naših bolesnika. Spearmanov test korelacije ne otkriva statističku značajnu povezanost genske ekspresije MMP-9 na mononuklearnim stanicama sa sedimentacijom eritrocita, C-reaktivnim proteinom, brojem leukocita i neutrofila. Međutim, registrira se statistički značajna korelacija između serumske razine MMP-9 i broja leukocita u perifernoj cirkulaciji.

MMP su regulirane na više razina: genskom ekspresijom i sekrecijom proteina, aktivacijom latentne forme MMP-a i inhibicijom aktivirane MMP-a.<sup>143</sup> Uobičajeno, ne postoji ekspresija metaloproteinaza u normalnom zdravom tkivu. Za razliku od toga, njihova ekspresija se može otkriti u mnogim bolesnim tkivima, kao i onima koji su prošli procese ozdravljenja. Ekspresija metaloproteinaza varira između tkiva, bolesti i upalnih stanja, a ekspresiju im potiču aktivirane stanice. MMP se izlučuju u inaktivnoj formi proenzima te se same aktiviraju ili ih aktiviraju drugi proteolitički enzimi na mjestu sekrecije što rezultira u degradaciji ECM. Tijekom pneumonije dolazi do destrukcije ECM koji može biti uzrokovan intezivnom aktivnošću MMP-a. Isto tako dolazi do masovnom ulaska neutrofila na mjesto upale koji isto tako u teškoj pneumoniji oštećuju tkivo.

Poznata je uloga MMP u migraciji T-limfocita preko struktura bazalne membrane. Leppert i sur. opisuju da *in vitro* da ekspresija MMP-2 i MMP-9 u T-limfocitima tijekom migracije preko bazalne membrane jednaka.<sup>201</sup> Dok je ekspresija MMP-2 inducibilna, MMP-9 je konstitutivna. Jedno drugo istraživanje pokazuju da je ekspresija MMP-2 i MMP-9 u T-limfocitima ovisna o aktivaciji nakon izlaganja kemotaksijskim faktorima ili citokinima, te da adhezija posredovana integrinom inducira ekspresiju MMP-2.<sup>203</sup>

Aktivnost MMP-2 i MMP-9 u malim količinama prisutna je u uzorcima donjeg dijela dišnog sustava u zdrave djece, a znatno više u različitim bolestima pluća.<sup>159</sup> U normalnim plućima pod različitim vrstama stimulacije MMP-9 produciraju epitelne stanice bronha, klara stanice, pneumociti tipa II, fibroblasti, glatke mišićne stanice i endotelne stanice. Uz to u plućima leukociti mogu biti izvor MMP-9. Njena uloga u plućima je najvećim dijelom nepoznata. Poznato je da izaziva migraciju bazalnih stanica i epitelnih stanica nakon oštećenja traheje. MMP-2 i MMP-9 kao supstrat preferiraju tip IV kolagena, laminin i fibronektin koji su značajni sastojci bazalnih membrana.<sup>204</sup> Budući da cijepa kolagen tip IV, može biti uključena u migraciju epitelnih stanica duž i preko bazalne membrane. Aktivnost MMP-2 i MMP-9 je pojačana u dišnim putovima miševa inficiranih *M. pulmonis*.<sup>173</sup> Porijeklo MMP-2 je endogeno i potječe iz epitelnih stanica, dok većina MMP-9 je egzogenog porijekla, od infiltrirajućih neutrofila. Osim toga mala količina MMP-9 potječe od bazalnih membrana krvnih žila ili drugih stanica.

Hartog i sur. su istraživali koncentraciju MMP-8, MMP-9 i TIMP-1 u BAL-u i plazmi bolesnika s pneumonijom.<sup>179</sup> Razina MMP-8 i MMP-9 je bila 13 puta viša nego u zdravih ispitanika, a u plazmi je MMP-8 bila 12, a MMP-9 četiri puta povišena u odnosu na kontrolu. Rezultat istraživanja sugerira da su neutrofilni glavni izvor MMP-8 i MMP-9 s razlikama u odnosu na lokaciju neutrofila. Bazalno oslobađanje MMP u plućnim neutrofilima je znatno veće nego onih iz periferije. Nakon stimulacije plućni neutrofilni ne oslobađaju više MMP, za razliku onih u perifernoj krvi što sugerira da su plućni neutrofilni već aktivirani.

Yang i sur. su uspoređivali koncentracije i aktivnost MMP-2 i MMP-9 u bolesnika s pneumonijom iz opće populacije.<sup>180</sup> Aktivnost i razina MMP-2 se ne razlikuje signifikantno između bolesnika i kontrolne skupine. S druge strane, aktivnost i koncentracija MMP-9 u bolesnika s pneumonijom je statistički značajno veća nego kontrolne skupine. Analiza linearnom regresijom nalazi da razina MMP-9 kolerira s brojem leukocita u bolesnika s pneumonijom prije liječenja, kao i brojem neutrofila prije i poslije liječenja, ali ne i s brojem limfocita i monocita. I u naših bolesnika se registrira korelacija broja leukocita i razine MMP-9 u serumu bolesnika.

Zaključno, za *M. pneumoniae* bi se moglo reći da izaziva sve veći interes istraživača zbog svojeg potencijala izvanplućne diseminacije. Mnogo napora je uloženo da se rasvijetli mehanizam mikoplazmatske patogeneze i veliki broj istraživanja sugerira da citokini, kemokini, metaloproteinaze, kao i još neki drugi medijatori upale koji se izlučuju od velikog broja različitih stanica tijekom infekcije igraju središnju ulogu u tome. Dosadašnja istraživanja su potvrdila da *M. pneumoniae* može inducirati različite citokine i kemokine u

bilo kojoj fazi infekcije. U ranoj fazi infekcije oni potiču migraciju imunoloških stanica na mjesto infekcije. Kolagenaze u tome isto tako igraju važnu ulogu tako da degradacijom komponenata ECM, poglavito bazalnih membrana olakšava stanicama imunološkog sustava daljnju migraciju.

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti kako IL-8, MIP-1 $\beta$  i MMP-9 sudjeluju u imunopatogenetskim promjenama tijekom pneumonije koju uzrokuje *M. pneumoniae*. Međutim, važno je naznačiti da kemokini, kao i metaloproteinaze tvore vrlo kompleksnu staničnu mrežu koja izvršava brojne funkcije, a koje ne ovise samo o interakciji između različitih upalnih medijatora, nego i o mikrookolini. Stoga, količina i priroda kemokina i metaloproteinaze, njihove ciljne stanice, priroda aktivirajućeg signala, vrijeme, njihov slijed djelovanja, kao i eksperimentalni model mogu imati učinka na rezultat specifičnog kemokina, odnosno metaloproteinaze. Isto tako, razlike u tipovima stanica i animalnim modelima mogu dijelom objasniti razliku u profilu kemokina i metaloproteinaza koje je inducirala *M. pneumoniae*. U radu s ljudima, veće varijacije kao što su, dob, spol, prehrana, zdravstveno stanje, životni stil i faktori okoliša mogu utjecati na dobivene rezultate. Iako je mreža citokina, kao i metaloproteinaza kompleksna, napredak nauke i sistematska istraživanja nam omogućuje bolje poznavanje cjelokupne mreže i u velikoj mjeri poboljšava naše razumijevanje imunološkog odgovora domaćina na infekciju uzrokovanu *M. pneumoniae*.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenih kliničkih i imunopatogenetskih istraživanja u bolesnika s upalom pluća koju uzrokuje *M. pneumoniae*, može se utvrditi slijedeće:

- Naši bolesnici su bili uglavnom mlađe dobi, težina kliničke slike je bila blaga do srednje teška, a nisu zabilježene komplikacije tijekom liječenja.
- Potvrđena je značajna uloga IL-8 u imunopatogenezi pneumonije uzrokovane *M. pneumoniae*, a po prvi put je pokazana značajno povišena ekspresija na razini perifernih mononukleara, kao i serumu bolesnika, kako u akutnoj, tako i u rekonvalescentnoj fazi bolesti.
- Iako je ekspresija gena za MIP-1 $\beta$  bila značajno pojačana u bolesnika u akutnoj i rekonvalescentnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu s dinamikom pada prema kraju bolesti, nije detektirana značajna razina ovog kemokina u serumu bolesnika.
- Genska ekspresija MIP-1 $\beta$  bila je u korelaciji s brojem neutrofila u perifernoj cirkulaciji bolesnika.
- Zanimljivo je da je serumska razina MCP-1 bila značajno snižena u akutnoj fazi bolesti.
- Po prvi put smo pokazali u kliničkoj studiji da metaloproteinaze imaju ulogu u imunopatogenezi pneumonija koje uzrokuje *M. pneumoniae*.
- Vrijednosti MMP-9 su bile kratko povišene u akutnoj fazi bolesti s normalizacijom u fazi rekonvalescencije, dok nasuprot tomu, za MMP-2 nalazimo snižene serumske razine u akutnoj fazi bolesti, s povratkom na normalne vrijednosti u fazi rekonvalescencije.
- Registrirana je korelacija između serumske razine MMP-9 i broja leukocita u perifernoj cirkulaciji.
- Iako nisu nađene korelacije imunoloških parametara s nekim drugim laboratorijskim nalazom ili kliničkim pokazateljom, moguće da bi još neke korelacije bile pokazane u bolesnika s težim oblikom bolesti, te u većoj skupini ispitanika.
- Iz naših istraživanja je jasno da analizirani kemokini i metaloproteinaze imaju važnu ulogu u imunopatogenezi pneumonija koje uzrokuje *M. pneumoniae*. Jasno je pri tome da značajan izvor ovih molekula u perifernoj cirkulaciji predstavljaju periferni

mononukleari, no indirektno možemo zaključiti da bi važan izvor mogle imati u prvom redu endotelne stanice, a moguće i neke druge molekule.

- Većina dosadašnjih istraživanja fokusirana su na lokalne imunoreakcije u plućima. Naše istraživanje jasno pokazuje značajne promjene i važnost kemokina i metaloproteinaza u perifernoj cirkulaciji i imuoreakcijama važnim za regrutaciju stanica i druge važne imunoreakcije.
- Daljnja *ex vivo* i *in vitro* istraživanja s humanim stanicama su potrebna da bi se odredila uloga pojedinih ispitivanih molekula u imunopatogenzi pneumonija koje uzrokuje *M. pneumoniae*.

## 7. SAŽETAK

Ovaj rad obuhvaća rezultate uloge beta kemokina i metaloproteinaza u imunopatogenezi pneumonije koju uzrokuje mikoplazma pneumonije. Svi bolesnici uključeni u istraživanje liječeni su u Klinici za infektivne bolesti (KIB) «Dr. Fran Mihaljević» u Zagrebu. U ispitivanje je ukupno uključeno 40 bolesnika muškog spola s atipičnom pneumonijom koju je uzrokovala mikoplazma pneumonije. Klinička dijagnoza pneumonije iz opće populacije definirana je akutnim početkom s povišenom temperaturom i rendgenskom potvrdom plućnog infiltrata. Etiološka dijagnoza bolesti potvrđena je serološkim testiranjem. Kontrolna skupina obuhvaća 20 zdravih muških ispitanika slične dobi kao bolesnici.

Prosječna životna dob naših bolesnika bila je 19 godina. Bolesnici su hospitalizirani najčešće petog dana bolesti. Klinička slika u naših bolesnika je bila blaga do srednje teška, što odgovara laboratorijskim nalazima kod prijema. Rendgenska snimka pluća registrira intersticijske upalne infiltrate u jednom (28 ili 70%), odnosno više režnjeva (12 ili 30%), a pleuralni izljev se bilježi u 6 ili 15% bolesnika. Na primjenjenu antibiotsku terapiju u svih bolesnika polučio se vrlo dobar klinički učinak. Tijekom hospitalizacije nisu zabilježene ozbiljnije komplikacije bolesti.

Niti u jednom od ispitivanih uzoraka bolesnika, kao niti kontrolne skupine nije se registrirala ekspresija gena za MMP-2. U 31 bolesnika u akutnom stadiju bolesti, 30 rekonvalescenata, odnosno 19 kontrolnih ispitanika bilježi se ekspresija gena za IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  i MMP-9. Ekspresija gena za MCP-1 bila je smanjena u većine bolesnika i nije se bitno razlikovala između naših bolesnika i kontrolne skupine. Ekspresija gena za IL-8 bila je statistički značajno povišena u bolesnika u akutnoj fazi bolesti i rekonvalescenciji u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney test;  $p=0,013$ ;  $p=0,001$ ). Isto tako, ekspresija gena za MIP-1 $\beta$  bila je statistički značajno povišena u bolesnika u akutnoj fazi bolesti i rekonvalescenciji u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney test;  $p<0,001$ ;  $p=0,001$ ). Ekspresija gena za MMP-9 bila je statistički značajno povišena u akutnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu i rekonvalescente (Mann-Whitney;  $p=0,001$ ;  $p=0,016$ ).

Spearmanovim testom korelacije u naših bolesnika nađe se značajna korelacija između genske ekspresije MIP-1 $\beta$  i broja neutrofila u perifernoj cirkulaciji.

Koncentracija IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 i MMP-9 u serumu učinjena je u 39 bolesnika u akutnoj fazi bolesti, 36 rekonvalescenata i 12 kontrolnih ispitanika.



Analizirajući razinu ispitivanih kemokina i metaloproteinaza registrira se statistički viša razina IL-8 u bolesnika u akutnoj fazi u odnosu na kontrolnu skupinu (Mann-Whitney test;  $p=0,033$ ). Isto tako, razina MMP-9 bila je viša u odnosu na kontrolne ispitanike, no bez statističke značajnosti (Mann-Whitney test;  $p=0,062$ ). Vrijednosti MCP-1 i MMP-2 su u akutnih bolesnika bile statističke značajno niže nego u kontrolnoj skupini (Mann-Whitney test;  $p=0,012$ ;  $p=0,001$ ) dok se razina MIP-1 $\beta$  nije bitno razlikovala između bolesnika i zdravih ispitanika.

Spearmanovim testom korelacije nađe se statistička značajna korelacija između broja leukocita u perifernoj cirkulaciji i serumske razine IL-8 u naših bolesnika. Nije se našla statistički značajna razlika u koncentraciji IL-8 i MMP-9 u bolesnika koji su imali pleuralni izljev (Mann-Whitney test;  $p=0,613$ ;  $p=0,726$ ). Također nije nađena statistički značajna razlika u koncentraciji IL-8 i MMP-9 između bolesnika koji su imali zahvaćena dva ili više plućnih režnjeva (Mann-Whitney test;  $p=0,228$ ;  $p=0,403$ ).

Ovi rezultati mogli bi pridonijeti daljnjim istraživanjima koja bi trebala objasniti imunopatogenetske mehanizme koji stoje u pozadini pneumonije uzrokovane mikoplazmom pneumonije.

## 8. SUMMARY

The results of research on the role of beta-chemokines and metalloproteinases in the immunopathogenesis of pneumonia caused by mycoplasma pneumoniae are presented in the dissertation. All patients included in the research were treated at the University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljevic" in Zagreb. A total of 40 male patients with atypical pneumonia caused by mycoplasma pneumoniae were included in this research. Clinical diagnosis of community acquired pneumonia was defined as acute infection with increased temperature and roentgenological finding of pulmonary infiltrate. Etiological diagnosis of disease was confirmed with serological testing. A control group included 20 healthy male examinees of similar age as the patients.

The average age of our patients was 19 years. The patients were most commonly hospitalized on the fifth day of illness. Clinical presentation of disease was mild up to moderately severe, in accordance with laboratory results on admission. Chest X-ray recorded interstitial inflammatory infiltrates in one (28 or 70%), or multiple lobes (12 or 30%), and pleural effusion was recorded in 6 or 15% of patients. Favorable clinical response to administered antibiotic therapy was recorded in all patients. More severe disease complications were not recorded during hospitalization.

MMP-2 gene expression was not recorded in any sample obtained from patients, nor from the control group of examinees. In 31 patients with acute stage of disease, 30 convalescents, i.e. 19 control examinees we recorded gene expression of IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  and MMP-9. MCP-1 gene expression was decreased in the majority of patients and did not significantly differ between the patients and the control group. IL-8 gene expression statistically significantly increased in patients in the acute phase of disease and during convalescence compared to the control group (Mann-Whitney test;  $p=0,013$ ;  $p=0,001$ ). Similarly, gene expression of MIP-1 $\beta$  was statistically significantly increased in patients in the acute phase of disease and in convalescence compared to control group (Mann-Whitney test;  $p<0,001$ ;  $p=0,001$ ). MMP-9 gene expression was statistically significantly increased in the acute phase of illness compared to control group and convalescents (Mann-Whitney;  $p=0,001$ ;  $p=0,016$ ).

Spearman's correlation test in our patients showed correlation between gene expression of MIP-1 $\beta$  and neutrophils count in peripheral circulation.

The concentration of IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MMP-2 and MMP-9 was measured in the serum of 30 patients in the acute phase of disease, 36 convalescents and 12 control examinees. By analyzing the level of examined chemokines and metalloproteinases, we recorded a statistically higher level of IL-8 in patients in the acute phase of illness than among those in the control group (Mann-Whitney test;  $p=0,033$ ). Similarly, the level of MMP-9 was higher compared to control examinees, but without statistical significance (Mann-Whitney test;  $p=0,062$ ). The levels of MCP-1 and MMP-2 in acute patients were statistically significantly lower than in the control group of patients (Mann-Whitney test;  $p=0,012$ ;  $p=0,001$ ) while the level of MIP-1 $\beta$  did not significantly differ between the patients and healthy examinees.

Spearman's correlation test showed statistical significance correlation between leukocytes count in peripheral circulation and IL-8 levels in the patients's sera. No statistically significant difference was found in IL-8 and MMP-9 concentration in patients with pleural effusion (Mann-Whitney test;  $p=0,613$ ;  $p=0,726$ ). Also, no statistically significant difference was detected in IL-8 and MMP-9 concentration between patients with two or more pulmonary lobes affected (Mann-Whitney test;  $p=0,228$ ;  $p=0,403$ ).

These results could contribute to further research that should explain immunopathogenic mechanisms in pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae*.

## 9. L I T E R A T U R A

1. Nocard E, Roux ER. Le microbe de la peripneumonie. Ann Inst Pasteur 1898;12:240-62.
2. Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. J Pathol Bacteriol 1935;40:93-105.
3. Dienes L, Edsall G. Observations on L-organisms of Klieneberger. Proc Soc Exp Biol Med 1937;36:740-4.
4. Eaton MD, Meiklejohn G, Van Herick W. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. J Exp Med 1944;79:649-67.
5. Chanock RM, Cook MK, Fox HH, Parrott RH, Huebner BJ. Serologic evidence of infection with Eaton agent in lower respiratory illness of childhood. N Engl J Med 1960;262:648-54.
6. Marmion BP, Goodburn GM. Effect of an inorganic gold salt on Eaton's primary atypical pneumonia agent and other observations. Nature 1961;189:247-8.
7. Chanock RM, Hayflick L, Barile MF. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc Natl Acad Sci USA 1962;48:41-9.
8. Chanock RM, Dienes L, Eaton MD, i sur. *Mycoplasma pneumoniae* proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton agent). Science 1963;140:662-2.
9. Edward D, Meiklejohn G, Freundt EA. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. J Gen Microbiol 1956;14:197-207.
10. Waites KB, Crabb DM, Bing X, Duffy LB. *In vitro* susceptibilities to and bactericidal activities of garenoxacin (BMS-284756) and other antimicrobial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:161-5.
11. Johansson KE, Pettersson B. Taxonomy of mollicutes. U: Razin S i Herrman R (ur.). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002:1-29.

12. Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res 1996;24:4420-49.
13. Balish MF, Krause DC. Cytadherence and the cytoskeleton. U: Razin S, Herrmann R (ur.). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002:491-518.
14. Powell DA, Hu PC, Wilson M, Collier AM, Baseman JB. Attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to respiratory epithelium. Infect Immun 1976;13:959-66.
15. Krivan HC, Olson LD, Barile MF, Ginsburg V, Roberts DD. Adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to sulfated glycolipids and inhibition by dextran sulfate. J Biol Chem 1989;264:9283-8.
16. Roberts DD, Olson LD, Barile MF, Ginsburg V, Krivan HC. Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins. J Biol Chem 1989;264:9289-93.
17. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding protein in *Mycoplasma pneumoniae*. Mol Microbiol 2002;46:1041-51.
18. Baseman JB, Reddy SP, Dallo SF. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:137-44.
19. Krause DC, Baseman JB. Inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* hemadsorption and adherence to respiratory epithelium by antibodies to a membrane protein. Infect Immun 1983;39:1180-6.
20. Krause DC, Leith DK, Wilson RM, Baseman JB. Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. Infect Immun 1982;35:809-17.
21. Dallo SF, Chavoya A, Baseman JB. Characterization of the gene for a 30-kilodalton adhesion-related protein of *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun 1990;58:4163-5.
22. Dallo SF, Baseman JB. Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. Microb Pathog 2000;29:301-9.

23. Tryon VV, Baseman JB. Pathogenic determinants and mechanisms. U: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB (ur.). *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, 1992:457-71.
24. Himmelreich R, Plagens H, Hilbert H, Reiner B, Herrmann R. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res* 1997;25:701-12.
25. Seggev JS, Sedmak GV, Kurup VP. Isotype-specific antibody responses to acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:67-73.
26. Hayashi S, Ichikawa Y, Fujino K, i sur. Analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in patients with pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Jpn J Thoracic Dis* 1986;24:162-7.
27. Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. Cytokines in *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:157-68.
28. Toews GB. Cytokines and the lung. *Eur Resp J* 2001;34:3-17.
29. Jones HP, Tabor L, Sun X, i sur. Depletion of CD8+ T cells exacerbates CD4+ Th cell-associated inflammatory lesions during murine mycoplasma respiratory disease. *J Immunol* 2002;168:3493-501.
30. Faulkner CB, Simecka JW, Davidson MK, i sur. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. *Infect Immun* 1995;63:4084-90.
31. Foy HM. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. *Clin Infect Dis* 1993;17 (Suppl.1):37-46.
32. Alexander ER, Foy HM, Kenny GE, i sur. Pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*. Its incidence in the membership of a co-operative medical group. *N Engl J Med* 1966;275:131-6.
33. Feikin DR, Moroney JF, Talkington DF, i sur. An outbreak of acute respiratory disease caused by *Mycoplasma pneumoniae* and adenovirus at a federal service training academy: new implications from an old scenario. *Clin Infect Dis* 1999;29:1545-50.
34. Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. *Epidem Infect* 2000;124:103-11.

35. Dumke R, Catrein I, Pirkil E, Herrmann R, Jacobs E. Subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. *Int J Med Microbiol* 2003;292:513-25.
36. Dorigo-Zetsma JW, Dankert J, Zaat SA. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. *J Clin Microbiol* 2000;38:965-70.
37. Jacobs E, Vonski M, Oberle K, Opitz O, Pietsch K. Are outbreaks and sporadic respiratory infections by *Mycoplasma pneumoniae* due to two distinct subtypes? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:38-44.
38. Sasaki T, Kenri T, Okazaki N, i sur. Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *J Clin Microbiol* 1996;34:447-9.
39. Gnarpe J, Lundback A, Sundelof B, Gnarpe H. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in subjectively healthy individuals. *Scand J Infect Dis* 1992;24:161-4.
40. Clyde WA. *Mycoplasma pneumoniae* infections of man. U: Tully JG, Whitcomb RF (ur). The mycoplasmas II. Human and animal mycoplasmas, vol II. Academic Press, New York, 1979:275-306.
41. Foy HM, Grayston JT, Kenny GE, Alexander ER, McMahan R. Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* infection in families. *JAMA* 1966;197:859-66.
42. Sande MA, Gadot F, Wenzel RP. Point source epidemic of *Mycoplasma pneumoniae* infection in a prosthodontics laboratory. *Am Rev Respir Dis* 1975;112:213-17.
43. Klausner JD, Passaro D, Rosenberg J, i sur. Enhanced control of an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia with azithromycin prophylaxis. *J Infect Dis* 1998;177:161-6.
44. Ursi D, Ursi JP, Ieven M, Docx M, Van Reempts P, Pattyn SR. Congenital pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;72:118-20.
45. Marston BJ, Plouffe JF, File TM, i sur. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance study in Ohio. *Arch Intern Med* 1997;157:1709-18.
46. Feizi T, Maclean H, Sommerville RG, Selwyn JG. Studies on an epidemic of respiratory disease caused by *Mycoplasma pneumoniae*. *Br Med J* 1967;1:457-60.

47. Luby JP. Pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin Chest Med 1991;12:237-44.
48. Stevens D, Swift PG, Johnston PG, Kearney PJ, Corner BD, Burman D. *Mycoplasma pneumoniae* infections in children. Arch Dis Child 1978;53:38-42.
49. Ali NJ, Sillis M, Andrews BE, Jenkins PF, Harrison BD. The clinical spectrum and diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Q J Med 1986;58:241-51.
50. Cassell GH, Clyde WA, Davis JK. Mycoplasma respiratory infections. U: Razin S, Barile MF (ur.). The mycoplasmas. Academic Press, New York, 1985:65-106.
51. Marrie TJ. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia requiring hospitalization, with emphasis on infection in the elderly. Arch Intern Med 1993;153:488-94.
52. Sabato AR, Martin AJ, Marmion BP, Kok TW, Cooker DM. *Mycoplasma pneumoniae*: acute illness, antibiotics and subsequent pulmonary function. Arch Dis Child 1984;59:1034-7.
53. Cimolai N, Wensley D, Seear M, Thomas ET. *Mycoplasma pneumoniae* as a cofactor in severe respiratory infections. Clin Infect Dis 1995;21:1182-5.
54. Sabato AR, Cooper DM, Thong YH. Transitory depression of immune function following *Mycoplasma pneumoniae* infection in children. Pediatr Res 1981;15:813-6.
55. Foy HM, Ochs H, Davis SD, Kenny GE, Luce RR. *Mycoplasma pneumoniae* infections in patients with immunodeficiency syndromes: report of four cases. J Infect Dis 1973;127:388-93.
56. Roifman CM, Rao CP, Lederman HM, Lavi S, Quinn P, Gelfand EW. Increased susceptibility to Mycoplasma infection in patients with hypogammaglobulinemia. Am J Med 1986;80:590-4.
57. Jensen JS, Heilmann C, Valerius NH. *Mycoplasma pneumoniae* infection in a child with AIDS. Clin Infect Dis 1994;19:207-8.
58. Chryssanthopoulos C, Eboriadou M, Monti K, Soubassi V, Sava K. Fatal disseminated intravascular coagulation caused by *Mycoplasma pneumoniae*. Pediatr Infect Dis J 2001;20:634-5.
59. Decanq HG, Lee FA. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Massive pulmonary involvement and pleural effusion. JAMA 1965;194:1010-1.
60. Fine NL, Smith LR, Sheedy PF. Frequency of pleural effusions in mycoplasma and viral pneumonia. N Engl J Med 1970;283:790-3.



61. Koletsky RJ, Weinstein AJ. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* infection. Report of a fatal case, and a review of the literature. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:491-6.
62. Narita M, Matsuzono Y, Itakura O, Togashi T, Kikuta H. Survey of mycoplasmal bacteremia detected in children by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1996;23:522-5.
63. Smith R, Eviatar L. Neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infections: diverse spectrum of diseases. A report of six cases and review of the literature. *Clin Pediatr* 2000;39:195-201.
64. Koskiniemi M. CNS manifestations associated with *Mycoplasma pneumoniae* infections: summary of cases at the University of Helsinki and review. *Clin Infect Dis* 1993;17(Suppl.1):52-7.
65. Maisel JC, Babbitt LH, John TJ. Fatal *Mycoplasma pneumoniae* infection with isolation of organisms from lung. *JAMA* 1967;202:287-90.
66. Chan ED, Welsh CH. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *West J Med* 1995;162:133-42.
67. Libre JM, Urban A, Garcia MA, Carrasco MA, Murcia C. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia associated with acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* 1997;25:1340-2.
68. Siegler DI. Lung abscess associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Br J Dis Chest* 1973;67:123-7.
69. Hindiyeh M, Carroll KC. Laboratory diagnosis of atypical pneumonia. *Semin Respir Infect* 2000;15:101-13.
70. Jacobs E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: a critical review of current procedures. *Clin Inf Dis* 1993;17:79-82.
71. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:242-56.
72. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000;31:342-82.
73. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004;697-728.
74. Kuzman I. *Mycoplasma pneumoniae*. U: Pnevmonije-uzročnici, dijagnostika, liječenje. Zagreb: Medicinska naklada 1999; 218-43..

75. Schönwald S, Kuzman I, Orešković K, i sur. Azithromycin: single 1.5 g dose in the treatment of patients with atypical pneumonia syndrome - a randomized study. *Infection* 1999;27:198-202.
76. Hyde TB, Gilbert M, Schwartz SB, i sur. Azithromycin prophylaxis during a hospital outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *J Infect Dis* 2001;183:907-12.
77. Gray GC, McPhate DC, Leinonen M, i sur. Weekly oral azithromycin as prophylaxis for agents causing acute respiratory disease. *Clin Infect Dis* 1998;26:103-10.
78. Kunkel SL, Strieter LM, Lindley IJ, Westwick J. Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol Today* 1995;16:559-61.
79. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392:565–8.
80. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:123–8.
81. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97–179.
82. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, i sur. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukocyte Biol* 1995;57:703–11.
83. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, i sur. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640–4.
84. Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, i sur. A molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* 1995;155:203–9.
85. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Ann Rev Immunol* 1997;15:675-705.
86. Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999;286:2098-102.
87. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, i sur. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10896-901.
88. Kim CH, and Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999;65:6-15.
89. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, i sur. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9448-53.

90. Hedrick JA, Helms A, Vicari A, Zlotnik A. Characterisation of a novel CC chemokine, HCC-4, whose expression is increased by interleukin-10. *Blood* 1998;91:4242–7.
91. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, i sur. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 1997;16:6996–7007.
92. Webb LMC, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7158–62.
93. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121–7.
94. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, i sur. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000;52:145-76.
95. Oppenheim JJ, Howard OMZ, Goetzl E. Chemotactic factors, neuropeptides, and other ligands for seven transmembrane receptors. In: *Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defence*, Academic Press, London (2000) 985–1021.
96. Streiter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, i sur. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:27348–56.
97. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, i sur. Platelet factor-IV inhibits the mitogenic activity of VEGF (121) and VEGF (165) using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem* 1995;270:15059–65.
98. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, i sur. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266:1395–9.
99. Combadiere C, Gao J, Tiffany HL, Murphy PM. Gene cloning, RNA distribution, and functional expression of mCX3CR1, a mouse chemotactic receptor for the CX3C chemokine fractalkine. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:728–32.
100. Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL-1). *J Immunol* 1987;139:788–93.
101. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, i sur. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9233–7.

102. Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, et al. Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1988;167:1883–93.
103. Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989; 10:299–304.
104. Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:755–61.
105. Detmers PA, Lo SK, Olsen EE, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 1990;171:1155–62.
106. White MV, Yoshimura T, Hook W, Kaliner M, Leonard EJ. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol Lett* 1989;22:151–4.
107. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989;243:1464–6.
108. Thelen M, Peveri P, Kern P, von Tscharnener V, Walz A, Baggiolini M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J* 1988;2:2702–6.
109. Leonard EJ, Yoshimura T, Tanaka S, Raffled M. Neutrophil recruitment by intradermal injected neutrophil attractant/activation protein-1. *J Invest Dermatol* 1991;96:690–4.
110. Kudo C, Araki A, Matsushima K, Sendo F. Inhibition of IL-8-induced W3/25+ (CD4+) T lymphocyte recruitment into subcutaneous tissues of rats by selective depletion of *in vivo* neutrophils with a monoclonal antibody. *J Immunol* 1991;147:2196–201.
111. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells *in vitro* is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 1993;151:2667–75.
112. Norgauer J, Metzner B, Schraufstatter I. Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells. *J Immunol* 1996;156:1132–7.

113. Khabar KS, Al-Zoghaibi F, Al-Ahdhal MN, i sur. The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. *J Exp Med.* 1997 6;186:1077-85.
114. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, Burdick MD, Strieter RM. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Invest* 1996;97:2792–802.
115. Miller EJ, Cohen AB, Nagao S, i sur. Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:427–32.
116. Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, i sur. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 1993;341:643–7.
117. Yokoi K, Mukaida N, Harada A, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of endotoxemia-induced acute respiratory distress syndrome-like lung injury in rabbits by a monoclonal antibody to IL-8. *Lab Invest* 1997;76:375–84.
118. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8 *Nature* 1993;365:654–7.
119. Wells TNC, Peitsch MC. The chemokine information source: identification and characterization of novel chemokines using the World Wide Web and expressed sequence tag databases. *J Leukocyte Biol* 1997;61:545–50.
120. Wada T, Yokoyama H, Tomosugi N, i sur. Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. *Kidney Intl* 1994;46:455–60.
121. Gale LM, McColl SR. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? *Bio Essays* 1999;21:17–28.
122. Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. *Dev Comp Immunol.* 2004;28:443-60.
123. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1990;20:254–7.
124. Furutani Y, Nomura H, Notake M, i sur. Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:249–55.
125. Jiang Y, Beller DI, Frenkle G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992;148:2423–8.

126. Zachariae CO, Anderson AO, Thompson HL, i sur. Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line. *J Exp Med* 1990;171:2177–82.
127. Ernoffsson M, Siegbahn A. Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemotactic protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. *Thromb Res* 1996;15:307–20.
128. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* 1992;175: 1271–5.
129. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3652–6.
130. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J* 1994;8:1055–60.
131. Ugucioni M, Loetscher P, Forsmann U, i sur. Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J Exp Med* 1996;183:2379–84.
132. Ugucioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *J Immunol* 1995;25:64–8.
133. Luo Y, D'Amore PA, Dorf ME. Beta-chemokine TCA3 binds to and activates rat vascular smooth muscle cells. *J Immunol* 1996;157:2143–8.
134. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996;271:17779–83.
135. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, i sur. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:602–11.
136. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1882-6.
137. Menten P, Wuyts A, von Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:455–81.
138. Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha,

- macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1183–90.
139. Luther SA, Cyster JC. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature* 2001;2:102–7.
  140. Murdoch C, Finn, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000;95: 3032–43.
  141. Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, i sur. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2000;1:83–7.
  142. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 2004;199:174-80.
  143. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-4.
  144. Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1994;732:11-21.
  145. Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* 1995;270:11555-66.
  146. Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1100-2.
  147. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-5.
  148. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994;7:2062-72.
  149. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2001;2:10-9.
  150. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:602-8.
  151. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, i sur. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 2001;69:851-9.
  152. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997;15:61-75.

153. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury: evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1145-54.
154. Braun J, O'Connor C. Measurement of proteases and antiproteases in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir Rev* 1999;9:76-85.
155. Brown GM, Brown DM, Donaldson K, Drost E, MacNee W. Neutrophil sequestration in rat lungs. *Thorax* 1995;50:661-7.
156. Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:749-54.
157. Delacourt C, Le Bourgeois M, D'Ortho MP, i sur. Imbalance between 95 kDa type collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases in sputum of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Care Med* 1995;152:765-74.
158. Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf C. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:288-95.
159. Winkler MK, Foldes JK, Bunn RC, Fowlkes JL. Implications for matrix metalloproteinases as modulators of pediatric lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:557-65.
160. Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ohmichi M, Abe S. Sputum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:900-5.
161. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, i sur. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1949-56.
162. Torii K, Iida K, Miyazaki Y, i sur. Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:43-6.
163. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinases-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:12-24.
164. Zeng B, Prasan A, Fung KC, i sur. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease. *Int Med J* 2005;35:331-5.



165. Hashimoto T, Wen G, Lawton MT, i sur. Abnormal expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in brain arteriovenous malformations. *Stroke* 2003;34:925-31.
166. Van den Steen PE, Wuyts A, Husson SJ, Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *Eur J Biochem* 2003;270:3739-49.
167. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000;96:2673-81.
168. Beck-Schimmer B, Madjdpour C, Kneller S, i sur. Role of alveolar epithelial ICAM-1 in lipopolysaccharide-induced lung inflammation. *Eur Respir J*. 2002;19:1142-50.
169. Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, i sur. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 2000;164:427-35.
170. Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. Regulation of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 2002;70:3649-55.
171. Kazachkov MY, Hu PC, Carson JL, i sur. Release of cytokines by human nasal epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *Exp Biol Med* 2002;227:330-5.
172. Kita M, Ohmoto Y, Hirai Y, i sur. Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas. *Microbiol Immunol* 1992;36:507-16.
173. Baluk P, Raymond WW, Ator E, Coussens LM, McDonald DM, Caughey GH. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression increases in *Mycoplasma*-infected airways but is not required for microvascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:307-17.
174. Pietsch K, Ehlers S, Jacobs E. Cytokine gene expression in the lungs of BALB/c mice during primary and secondary intranasal infection with *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* 1994;140:2043-8.
175. Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, i sur. Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine *Mycoplasma pneumoniae*

- pneumonia model: a microbiologic, histologic, immunologic, and respiratory plethysmographic profile. *Infect Immun* 2001;69:3869-76.
176. Sun X, Jones HP, Hodge LM, Simecka JW. Cytokine and chemokine transcription profile during *Mycoplasma pulmonis* infection in susceptible and resistant strains of mice: macrophage inflammatory protein 1-beta (CCL4) and monocyte chemoattractant protein 2 (CCL8) and accumulation of CCR5+ Th cells. *Infect Immun* 2006;74:5943-54.
  177. Simecka JW. Beta-chemokines are produced in lungs of mice with mycoplasma respiratory disease. *Curr Microbiol* 1999;39:163-7.
  178. Jones HP, Tabor L, Sun X, i sur. Depletion of CD8+ T cells exacerbates CD4+ Th cell-associated inflammatory lesions during murine mycoplasma respiratory disease. *J Immunol* 2002;168:3493-501.
  179. Hartog CM, Wermelt JA, Sommerfeld CO, Eichler W, Dalhoff K, Braun J. Pulmonary matrix metalloproteinase excess in hospital-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:593-8.
  180. Yang SF, Chu SC, Chiang IC, i sur. Excessive matrix metalloproteinase-9 in the plasma of community-acquired pneumonia. *Clin Chim Acta* 2005;352:209-15.
  181. Koh YY, Park Y, Lee HJ, Kim CK. Levels of interleukin-2, interferon-gamma, and interleukin-4 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with *Mycoplasma pneumoniae*: Implication of tendency toward increased immunoglobulin E production. *Pediatrics* 2001;107:E39.).
  182. Kragstjerg P, Jones I, Vikerfors T, Holmberg H. Diagnostic value of blood cytokine concentrations in acute pneumonia. *Thorax* 1995;50:1253-7.
  183. Mizukane R, Kadota Ji J, Yamaguchi T, i sur. An elderly patient with hemophagocytic syndrome due to severe *Mycoplasma pneumoniae* with marked hypercytokinemia. *Respiration* 2002;69:87-91.
  184. Ito S, Abe Y, Kinomoto K, i sur. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia with marked elevation of serum soluble interleukin-2 receptor. *Intern Med* 1995;34:430-5.
  185. Bohnet S, Kotschau U, Braun J, Dulhoff K. Role of interleukin-8 in community-acquired pneumonia: relation to microbial load and pulmonary function. *Infection* 1997;25:95-100.

186. Narita M, Tanaka H, Yamada S, et al. Significant role of interleukin-8 in pathogenesis of pulmonary disease due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:1028-30.
187. Hsieh CC, Tang RB, Tsai CH, Chen W. Serum interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha concentrations in children with *Mycoplasma pneumoniae*. J Microbiol Immunol Infect 2001;34:109-12.
188. Lieberman D, Livnat S, Schlaeffer F, Porath A, Horowitz S, Levy R. IL-1 beta and IL-6 in community-acquired pneumonia: bacteremic pneumococcal pneumonia versus *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Infection 1997;25:90-4.
189. Maseguer MA, Alvarez A, Rejas MT, Sanchez C, Perez-Diaz JC, Baquero F. *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. Infect Genet Evol 2003;3:47-55.
190. Simecka JW, Patel P, Davis JR, Ross SE, Otwell P, Cassell GH. Specific and nonspecific antibody responses in different segments of the respiratory tract in rats infected with *Mycoplasma pulmonis*. Infect Immun 1991;59:3715-21.
191. Hodge LM, Marinaro M, Jones HP, McGhee JR, Kiyono H, Simecka JW. Immunoglobulin A (IgA) responses and IgE-associated inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization. Infect Immun 2001;69:2328-38.
192. Liang SC, Simecka JW, Lindsey JR, Casell GH, Davis JK. Antibody responses after Sendai virus infection and their role in upper and lower respiratory tract disease in rats. Lab Anim Sci 1999;49:385-94.
193. Cartner SC, Lindsey JR, Gibbs-Erwin J, Cassell GH, Simecka JW. Roles of innate and adaptive immunity in respiratory mycoplasmosis. Infect Immun 1998;66:3485-91.
194. Fearon DL, Locksley RM. The instructive role of the innate immunity in the acquired immune response. Science 1996;272:50-54.
195. Broaders SA, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* subtype-independent induction of proinflammatory cytokines in THP-1 cells. Microbial Pathogenesis 2006;40:286-92.
196. Chmura K, Bai X, Nakamura M, et al. Induction of IL-8 by *Mycoplasma pneumoniae* membrane in BEAS-2B cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; (in press).

197. Fernandez-Serrano S, Dorca J, Coromines M, Carratalà J, Gudiol F, Manresa F. Molecular inflammatory responses measured in blood of patients with severe community-acquired pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:813-20.
198. Rollins S, Colby T, Clayton F. Open lung biopsy in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Arch Pathol Lab Med* 1986;110:34-41.
199. Rios AM, Mejias A, Chavez-Bueno S, i sur. Impact of cethromycin (ABT-773) therapy on microbiological, histologic, immunologic, and respiratory indices in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae* lower respiratory infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2897-904.
200. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997;89:3503-21.
201. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration *in vitro*. *J Immunol* 1995;154:4379-89.
202. Monntgomery AM, Sabzevari H, Reisfeld RA. Production and regulation of gelatinase B by human T-cells. *Biochim Biophys Acta* 1993;1176:265-8.
203. Xia MD, Leppert D, Hauser SL, i sur. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* 1996;156:160-7.
204. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-1 collagen and other matrix components. *Biochem J* 1995;309:299-306.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen 09. veljače 1961. u Imotskome, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Drage Stipca 6, HR-10000, Zagreb

Zaposlenje: Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević" Zagreb

Telefon: 01/4603-222

E-mail: [ipuljiz@bfm.hr](mailto:ipuljiz@bfm.hr)

### Školovanje i radno iskustvo:

1967.-1975. Osnovna škola Runovići

1975.-1979. Srednja škola (CUO P. Lozo), Imotski

1979.-1985. Medicinski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

1985.-1991. Liječnik opće medicine DZ Imotski

1991.-1996. Specijalizacija iz Infektologije

1996. Odjelni liječnik specijalist na Odjelu za akutne respiratorne infekcije i nejasna febrilna stanja Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“

Stručni Poslijediplomski studij „Hitna i intenzivna medicina“, Medicinski fakultet, Zagreb

1998. Znanstveni Poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet, Zagreb

2002. Stručni suradnik u projektu Ministarstva znanosti i tehnologije: "Pneumonije: dijagnostički i terapijski algoritmi" voditelja prof. dr. sc. Ilije Kuzmana

2003. Obranjena magistarska teza "Kliničke i epidemiološke značajke pneumonija uzrokovanih klamidijom pneumonije"

2006. predavač na Visokoj zdravstvenoj školi u Zagrebu

2007. Pročelnik Odjela za opću infektologiju Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ Zagreb

2007. stručni suradnik u projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH: "Imunoreakcije na hantaviruse i leptospire" voditelja prof. dr. sc. Alemke Markotić

2008. stručni suradnik u projektu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH:

"Istraživanje etiologije i patogeneze pneumonija" voditelja prof. dr. sc. Ilije Kuzmana

## Objavljeni radovi:

- Turčinov D, Kuzman I, **Puljiz I**. Brill-Zinsserova bolest još se pojavljuje u Hrvatskoj: retrospektivna analiza 25 hospitaliziranih bolesnika. Liječ Vjesn 2002;124:293-6.
- Kuzman I, Kirac P, Kuzman T, **Puljiz I**, Bilić V. Kuzman I, Kirac P, Kuzman T, **Puljiz I**, Bilić V. Spontana ruptura slezene u infektivnoj mononukleozi: prikaz bolesnika uz pregled literature. Acta Med Croatica 2003;57:141-3.
- Kuzman I, **Puljiz I**, Turčinov D, i sur. Najveća epidemija hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom u Hrvatskoj. Acta Med Croatica 2003;57:337-46.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Turčinov D, Markotić A, Čeljuska E. Kliničke i epidemiološke značajke hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom u bolesnika liječenih u Klinici za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” u Zagrebu. Acta Med Croatica 2003;57:347-53.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Bayer K, Makek N, Desnica B. Polimikrobna sepsa i peritiflitički apsces: prikaz bolesnika i pregled literature. Acta Med Croatica 2004;58:341-5.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Markotić I, Turčinov D, Matić M, Makek N. Electrocardiographic changes in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. Scand J Infect Dis 2005;37:594-8.
- **Puljiz I**, Beus A, Kuzman I, Seiwert S. Electrocardiographic changes and myocarditis in trichinellosis: a retrospective study of 154 patients. Ann Trop Med Parasitol 2005;99:403-11.
- Kuzman I, **Puljiz I**, Đaković-Rode O. Cure of Q fever pneumonia with moxifloxacin: case report. Scand J Infect Dis 2005;37:778-80.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Turčinov D, Makek N, Markotić A. Analiza laboratorijskih nalaza u bolesnika s hemoragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom. Acta Med Croatica 2005;59:105-11.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Đaković-Rode O. Kliničke i epidemiološke značajke Q-groznice u hospitaliziranih bolesnika. Infektol Glasn 2005;25:75-80.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Đaković-Rode O, Schönwald N, Miše B. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: comparison of clinical,

epidemiological characteristics and laboratory profiles. *Epidemiol Infect* 2005;29:1-8.

- Kuzman I, **Puljiz I**. Legionarska bolest: praktički pristup dijagnostici i liječenju. *Medicus* 2005;107-13.
- **Puljiz I**, Kuzman I. Gripa – uvijek aktualna bolest. *Medicus* 2005;14:137-46.
- **Puljiz I**, Kuzman I. Ptičja gripa. *Medicus* 2005;14:151-2.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Đaković-Rode O, Vukelić D, Marušić P. Splenic Cat-scratch disease: case report and review of the literature. *Infect Med* 2006; 23:182-4.
- **Puljiz I**, Kuzman I, Đaković-Rode O, Žužul Kasalica R. Bell's palsy associated with Q fever. *Infect Med* 2006;23:619-22.
- Vukelić D, Benić B, Bozinović D, Vuković B, Dakovic Rode O, Culig Z, Vuković J, Batinica S, Visnjić S, **Puljiz I**. An unusual outcome in a child with hepatosplenic cat-scratch disease. *Wien Klin Wochenschr.* 2006;118:615-8.
- **Puljiz I**, Begovac J. Tuberculosis in HIV-infected patients in Croatia between 1986 and 2005. *Coll Antropol.* 2006;30 (Suppl 2):53-8.