

# Genetička podloga urođene imunosti u kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti i karcinomu pluća

---

Sokolović, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:105:567748>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-30**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Irena Sokolović**

***Genetička podloga urođene imunosti u  
kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti i  
karcinomu pluća***

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2021.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Irena Sokolović**

***Genetička podloga urođene imunosti u  
kroničnoj opstruktivnoj plućnoj bolesti i  
karcinomu pluća***

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2021.**

Disertacija je izrađena na Klinici za pulmologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Jordanovac 104 i u Laboratoriju za naprednu genomiku, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, Bijenička cesta 54.

Voditelji rada:

**Prof.dr.sc. Marko Jakopović**, dr.med., specijalist internist, pročelnika Zavoda za tumore pluća i sredoprsja, Klinika za pulmologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb

**Doc.dr.sc. Jelena Knežević**, viša znanstvena suradnica, Laboratorij za naprednu genomiku, Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Marku Jakopoviću i doc. dr. sc. Jeleni Knežević na uloženom trudu, vrijednim savjetima i nesebičnoj pomoći. Hvala mojoj obitelji i prijateljima na strpljenju i podršci.

## SADRŽAJ

1 UVOD I SVRHA RADA .....	1
1.1 Kronična opstruktivna plućna bolest i karcinom pluća .....	1
1.1.1 Epidemiologija i klasifikacija KOPB-a i karcinoma pluća .....	1
1.1.2. Patofiziološke poveznice KOPB-a i karcinoma pluća .....	3
1.2 Urođeni imunološki sustav .....	6
1.2.1 Stanice imunološkog sustava .....	6
1.2.2 Receptori urođenog imunološkog sustava.....	7
1.2.3 Imunološki dogovor .....	8
1.3 Toll-like receptori .....	11
1.3.1 Struktura i stanična lokalizacija TLR-a.....	11
1.4 Poremećaj imunološkog odgovora - poveznica KOPB-a i karcinoma pluća.....	16
1.5 Uloga polimorfizma u genima za Toll-like receptore u razvoju upalnih i malignih bolesti.....	20
1.6 Povezanost SNP-a gena za TLR-e sa upalnim medijatorima uključenim u razvoj karcinoma.....	24
1.7 Svrha rada .....	27
2 HIPOTEZA.....	28
3 CILJEVI RADA .....	29
3.1 Opći ciljevi.....	29
3.2 Specifični ciljevi .....	30
4 MATERIJALI I METODE.....	31
4.1 Ispitanici.....	31
4.2 Analiza demografskih podataka.....	33
4.3 Izdvajanje genomske DNA metodom izoljavanja.....	35
4.4 Genotipizacija uzoraka metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu .....	36
4.5 Analiza baza podataka i kriteriji odabira SNP-ova za analizu.....	38
4.6 Određivanje prisutnosti citokina imunoenzimskim testom.....	39

4.7 Statistička analiza podataka .....	42
5 REZULTATI .....	43
5.1 Rezultati analize općih karakteristika ispitanika.....	43
5.2 Rezultati analize odabira polimorfnih biljega.....	50
5.3 Učinak SNP-a na rizik razvoja karcinoma pluća .....	52
5.3.1 Rezultati analize povezanosti polimorfizama u genima za TLR-e kod ispitanika sa KOPB-om i karcinomom pluća .....	53
5.3.2 Rezultati analize povezanosti polimorfizama u genima za TLR-e kod ispitanika sa KOPB-om i ispitanika sa KOPB-om i karcinomom pluća .....	55
5.3.3 Rezultati analize povezanosti polimorfizama u genima za TLR-e kod ispitanika sa karcinomom pluća i ispitanika sa KOPB-om i karcinomom pluća.....	57
5.4 Učinak SNP-a na rizik razvoja karcinoma pluća nakon prilagodbe na dob i spol	59
5.5 SNP rs2072493 gena TLR 5 i koncentracija IL-6 u serumu.....	63
5.6 Povezanost polimorfizama gena TLR5 sa težinom KOPB-a i stadijem karcinoma pluća.....	65
5.6.1. Rezultati povezanosti SNP-a rs5744174 s kliničkim parametrima ispitanika .....	65
5.6.2. Rezultati povezanosti SNP-a rs725084 s kliničkim parametrima ispitanika	68
5.6.3. Rezultati povezanosti SNP-a rs2072493 s kliničkim parametrima ispitanika .....	70
6 RASPRAVA.....	72
7 ZAKLJUČAK.....	83
8 SAŽETAK .....	85
9 SUMMARY .....	86
10 LITERATURA .....	87
11 ŽIVOTOPIS .....	104

## POPIS OZNAKA I KRATICA

KOPB - kronična opstruktivna plućna bolest

KP - karcinom pluća

NSCLC - nesitnostanični karcinom pluća (eng. non-small cell lung cancer)

SCLC - sitnostanični karcinom pluća (eng. small cell lung cancer)

SqCC - karcinom pločastih stanica (eng. squamous cell lung cancer)

AdCa - adenokarcinom

LCLC - karcinom velikih stanica (eng. large cell lung cancer)

FEV 1 - forsirani ekspiratorni volumen u 1 sekundi (eng. forced expiratory volume)

FVC - forsirani vitalni kapacitet (eng. forced vital capacity)

DLCO - kapacitet difuzije ugljičnog monoksida (eng. diffusing capacity for carbon monoxide)

A1AT -  $\alpha$ 1 antitripsin

DC - dendritičke stanice (eng. dendritic cells)

NK - stanice prirodne ubojice (eng. natural killer)

APC - antigen-prezentirajuće stanice (eng. antigen-presenting cells)

PRR - receptori za prepoznavanje obrazaca (eng. pattern recognition receptors)

TLR - Toll-like receptor

ROS - reaktivne vrste kisika (eng. reactive oxygen species)

RNS - reaktivne vrste dušika (eng. reactive nitrogen species)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid)

NF- $\kappa$ B - nuklearni faktor aktiviran B stanicama (eng. nuclear factor kappa B)

TNF $\alpha$  - tumor nekrotizirajući faktor alfa (eng. tumor necrosis factor  $\alpha$ )

IL - interleukin

CD - glikoprotein na površini T-stanica (eng. cluster of differentiation)

MHC - glavni kompleks tkivne kompatibilnosti (eng. major histocompatibility complex)

SNP - polimorfizam jednog nukleotida (eng. single nucleotide polymorphism)

PAMP - patogeni pridruženi molekularni slijedovi (eng. pathogen-associated molecular patterns)

DAMP – molekularni slijedovi povezani sa ozljedom (eng. damage-associated molecular patterns)

dsRNA – dvolančana ribonukleinska kiselina (eng. double-stranded ribonucleic acid)

ssRNA – jednolančana ribonukleinska kiselina (eng. single-stranded ribonucleic acid)

CpG DNA - citidin-fosfogvanozinski odsječak deoksiribonukleinske kiseline (eng. cytidine-phosphateguanosine)

LRR - leucinom bogata ponavljanja (eng. leucine rich repeats)

TIR - signalna domena receptora Toll / interleukin (eng. Toll-Interleukin receptor)

MyD88 - myeloid differentiation primary-response protein 88

IRAK - interleukin1-receptor-associated kinase

TAK1 - transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )-activated kinase

TRAF6 - tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6

IFN - interferon

IRF - interferon regulacijski faktor

TIRAP - TIR-domain-containing adaptor protein

TRIF - TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- $\beta$

TRAM - TRIF-related adaptor molecule

CRP – C-reaktivni protein

GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

BMI - body mass index

PY - pack-year

TNM - tumor, nodes, metastases

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

RCLB - red cell lysis buffer

UV/VIS - ultraviolet - visible spectroscopy

PCR - reakcija lančanog umnožavanja (eng. polymerase chain reaction)

MAF - minor allele frequency

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

OR - omjer vjerojatnosti (eng. odds ratio)

CI - interval pouzdanosti (eng. confidence interval)



# 1 UVOD I SVRHA RADA

## 1.1 Kronična opstruktivna plućna bolest i karcinom pluća

### 1.1.1 Epidemiologija i klasifikacija KOPB-a i karcinoma pluća

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) i karcinom pluća (KP) jedne su od najučestalijih respiratornih bolesti koje odlikuje visok stupanj genetske raznolikosti i osjetljivost na okolišne čimbenike rizika (1). Da se sklonost za razvoj karcinoma pluća može povezati ili čak preklapati s osjetljivošću za razvoj KOPB-a prvi su opazili Cohen i suradnici prije više od 40 godina (2).

KOPB obuhvaća više od 5% stanovništva, a povezan je s visokom smrtnošću utječući na oko 3,2 milijuna smrtnih slučajeva u 2015. godini u svijetu (3). Glavni je uzrok globalnog morbiditeta i mortaliteta, s 328 milijuna oboljelih i oko 4 milijuna smrtnih slučajeva godišnje. Trenutno je treći vodeći uzrok smrti na globalnoj razini, a za 15 godina se očekuje da postane vodeći uzrok smrti (4). Prema GOLD (eng. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) kriterijima (5) težina KOPB-a definirana je sustavom ABCD čija se procjena temelji na karakteristikama bolesti. Procjena uzima u obzir sljedeće aspekte bolesti: prisutnost i težinu spirometrijom određenog ograničenja protoka zraka definiranog forsiranim izdisajnim volumenom u prvoj sekundi (FEV1); težinu i učestalost simptoma (procijenjenih mMRC (eng. *modified Medical Research Council*) ili CAT (eng. *COPD Assessment Test*) skalama) te povijest, odnosno budući rizik pogoršanja (6). Prema potonjem, bolesnike se smješta u skupine A, B, C ili D, s obzirom na rizik od pogoršanja prema ograničenju protoka zraka ili povijesti egzacerbacija.

Stopa obolijevanja od KOPB-a raste oko 1 - 2% godišnje, a procjenjuje se da bi populacija KOPB-a do 2030. mogla doseći 85 milijuna, od čega oko 1% godišnje razvije karcinom pluća (7).

Karcinom pluća jedan je od najčešćih oblika karcinoma u svijetu, godišnje se otkriva 1,8 milijuna novih slučajeva, a godišnje smrtno strada 1,6 milijuna (8). Prema izvješću o globalnom opterećenju karcinomom (GLOBOCAN 2020), za oba spola, karcinom pluća je drugi najčešće dijagnosticirani karcinom (11,4% od ukupnog broja

slučajeva) i vodeći uzrok smrti od karcinoma (18% od ukupnog broja umrlih od karcinoma) (9). U Hrvatskoj je 2020. godine karcinom pluća drugi najčešći novodijagnosticirani karcinom (3.235) sa najvećom stopom mortaliteta (66,9/100000), a na razini Europske unije je četvrta najčešće dijagnosticirana zloćudna bolest (318.000, 11,9%) i najčešći je uzrok smrti od karcinoma (20,4%) (10).

Karcinom pluća podijeljen je u dvije glavne skupine: nesitnostanični karcinom pluća (eng. NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*) i sitnostanični karcinom pluća (eng. SCLC, *Small Cell Lung Cancer*). NSCLC čini 85% svih karcinoma pluća, a nadalje se dijeli u karcinom pločastih stanica (eng. SqCC, *Squamous Cell Lung Cancer*), adenokarcinom (eng. AdCa, *Adenocarcinoma*) i karcinom velikih stanica (eng. LCLC, *Large Cell Lung Cancer*) (11).

Adenokarcinomi pluća, koji čine 40% svih dijagnosticiranih karcinoma pluća, je maligna novotvorina epitela sa žljezdanom diferencijacijom i stvaranjem mucina, obično nastaje u stanicama koje oblažu alveole tvoreći periferno smješten tumor (12). Karcinom pločastih stanica (SqCC) nastaje iz pločastog epitela velikih dišnih putova sa morfološkim značajkama keratinizacije i međustaničnih mostova (13). To je spororastući tumor koji je uobičajeno povezan sa pušenjem. Iako se adenokarcinom najčešće dijagnosticira kod pušača, to je i najčešća inačica NSCLC-a kod nepušača (14). U Hrvatskoj 85% dijagnosticiranih karcinoma pluća čine bolesnici sa nesitnostaničnim karcinomom pluća (15).

Karcinom velikih stanica (LCLC) slabo je diferenciran tip nesitnostaničnog karcinoma pluća koji potječe od epitelnih stanica, no nema morfološka i imunohistokemijska obilježja adenokarcinoma, karcinoma pločastih stanica ili neuroendokrinog karcinoma. Tumorske stanice su velike i poligonalne i obično brzo rastu i šire se u bilo kojem dijelu pluća (12).

Neuroendokrini tumori relativno su česti tumori pluća, koji čine oko 20% do 25% karcinoma pluća. Njihove zajedničke morfološke, imunohistokemijske i strukturne značajke razlikuju ih od ostalih tumora pluća. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije za 2015. godinu razdvaja ovu skupinu tumora u 4 glavne kategorije, uključujući tipični karcinoid, atipični karcinoid, karcinom malih stanica (SCLC) i neuroendokrini karcinom velikih stanica (LCNEC) (16).

Sitnostanični karcinomi ili karcinomi malih stanica (SCLC) čine nešto više od 10% svih karcinoma pluća. Stanice sitnostaničnog karcinoma pluća su obično smještene u blizini bronha, male su veličine i postoji velika brzina dijeljenja tumorskih stanica (mitotička stopa). Izloženost duhanskom dimu prisutna je u gotovo svim slučajevima SCLC-a i vrlo je agresivan zloćudni tumor (12), (17).

Korištenjem panela imunohistokemije i molekularne analize genetskih promjena karcinoma pluća, većina morfološki dijagnosticiranih karcinoma pluća može se detaljnije klasificirati.

### 1.1.2. Patofiziološke poveznice KOPB-a i karcinoma pluća

Fenotipski KOBP i karcinom pluća predstavljaju vrlo različite bolesti. KOBP ima značajke kroničnog oštećenja pluća, koje karakteriziraju nepovratno ograničenje protoka zraka, upala malih dišnih putova i progresivno uništavanje parenhima pluća što rezultira emfizemom (18). Suprotno tome, karcinom pluća karakteriziraju oštećenja DNK koja rezultiraju prekomjernom proizvodnjom stimulativnih proteina, prekomjernom neuređenom proliferacijom i neispravnom regulacijom staničnog ciklusa (19). Iako je izloženost duhanskom dimu glavni čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća i KOBP-a, samo 10–20% pušača oboli od KOPB-a, a 10–15% osoba oboli od karcinoma pluća unatoč tome što nikada nisu pušili (19). (45).

Pušači imaju 15 do 30 puta povećan rizik za razvoj karcinoma pluća u usporedbi s nepušačima, no neće svi pušači razviti karcinom pluća, što ukazuje na prisutnost ostalih čimbenika koji utječu na rizik za razvoj karcinoma povezan s pušenjem (20). Dokazano je da je rizik za razvoj karcinoma pluća povećan kod pušača s KOPB-om do 5 puta u usporedbi s pušačima s istovjetnom izloženošću duhanskom dimu ali bez KOPB-a (21). Uništavanje dišnih putova, hiperinflacija pluća i zarobljavanje zraka oštećuju pluća kod osoba s KOPB-om i ove ponavljajuće ozljede pluća uzrokuju ograničenje protoka zraka, što dodatno pridonosi oštećenom čišćenju udahnutih toksičnih čestica i njihovoj povećanoj izloženosti na razini dišnog epitela (22). Među pušačima, KOBP je važan čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća i prethodi karcinomu pluća u do 70–80% slučajeva (23). Postupno ograničenje protoka zraka u KOPB-u ometa normalan proces

disanja i povezano je s nepravilnom upalnom reakcijom pluća potaknutom štetnim tvarima poput duhanskog dima (24). Međutim, zabilježeno je da prisutnost blagog emfizema, čak i bez vidljive opstrukcije, neovisno o pušačkom statusu, predstavlja značajan rizik za razvoj karcinoma pluća (25). Skillrud i suradnici procijenili su da je kumulativna vjerojatnost razvoja karcinoma pluća u roku od 10 godina bila 8,8% za one s KOPB-om u odnosu na 2,0% za bolesnike s normalnom plućnom funkcijom (26). Stoga se KOPB smatra najvećim neovisnim faktorom rizika za razvoj karcinoma pluća, neovisno o pušačkom statusu.

Individualni rizik za razvoj KOPB-a, karcinoma pluća ili obje bolesti, određuju složeni mehanizmi i međudjelovanja, uključujući izloženost okolišnim čimbenicima i predispozicijski čimbenici domaćina. Potencijalni čimbenici rizika uključuju izloženost onečišćenju zraka i okolišnim ili profesionalnim toksinima koji djeluju nadražujuće i karcinogeno. Strukturne i funkcionalne abnormalnosti (smanjena diferencijacija cilijarnih stanica, usporen proces regeneracije cilija, smanjena pokretljivost, nepravilna organizacija i skraćenje cilija (27)) u kombinaciji s pojačanim lučenjem sluzi i povećanom viskoelastičnosti izlučene sluzi mogu dovesti do opstrukcije dišnih putova i pospješiti zarobljavanje štetnih tvari u dišnim putovima bolesnika s KOPB-om (28). Druga značajka koja se često primjećuje u dišnim putovima bolesnika s KOPB-om je pločasta metaplazija koja je povezana s težinom opstrukcije dišnih putova (29). Kronično izlaganje štetnim okolišnim tvarima negativno utječe na epitel dišnih putova upalnim i imunosupresivnim mehanizmima, a upala može izazvati metaplastične lezije u ne-neoplastičnim uvjetima, te se pokazalo da je razvoj karcinoma pluća moguć u takvom mikrookolišu (30).

Preklapanje KOPB-a i karcinoma pluća može postojati i izvan njihovih patogenetskih procesa povezanih sa pušenjem i izlaganjem štetnim česticama iz okoliša kroz zajedničku genetsku sklonost. Budući da se KOPB ne razvija kod svih pušača, genetska sklonost je jedno od vjerojatnih objašnjenja za razvoj upale dišnih putova i opstruktivnih promjena. Nasljedni nedostatak  $\alpha$ 1 antitripsina (A1AT) predstavlja jedan od rijetkih jasno utvrđenih nasljednih čimbenika za nastanak i razvoj KOPB-a. A1AT je inhibitor neutrofilne proteinaze koja razgrađuje elastin, protein koji plućima omogućava sposobnost vraćanja u prvotno stanje nakon udaha (31). Manjak alfa-antitripsina genetski je poremećaj (mutacija gena SERPINA1) koji dovodi do ranog početka emfizema u

homozigotnih pojedinaca. Potencijalnu vezu između karcinoma pluća i nedostatka A1AT prvi su spoznali Harris i suradnici 1974. godine (32). Yang i suradnici dokazali su da nositelji alela za nedostatak A1AT (heterozigotni SZ genotip) imaju 70% veći rizik za razvoj karcinoma pluća (33) te bi manjak A1AT mogao doprinijeti tumorogenezi pluća uslijed gubitka unutarstaničnih proapoptotičkih svojstava A1AT (34). Doprinos nasljednih čimbenika razvoju karcinoma pluća (procjenjuje se na 15 - 25%) gotovo je tri puta manji od genetskog utjecaja na plućnu funkciju (FEV1) za KOPB (procjenjuje se na 40 - 77%), a prisutnost KOPB-a povezana je sa šest puta većim rizikom od razvoja karcinoma pluća u odnosu na pušače s normalnom plućnom funkcijom pluća (35). Pacijenti čiji su rođaci u prvom koljenu imali KOPB ili karcinom pluća imali su povećan rizik od opstruktivnih promjena dišnih putova, sa ili bez anamneze o pušenju, a pušači s obiteljskom anamnezom ranog karcinoma pluća imali su veći rizik za razvoj karcinoma pluća u usporedbi s pušačima bez pozitivne obiteljske anamneze (36). Ova zapažanja upućuju na to da, ne samo da je KOPB važan fenotip koji utječe na razvoj karcinoma pluća, već da su geni, koji doprinose sklonosti KOPB-u, također značajni za sklonost karcinomu pluća.

## 1.2 Urođeni imunološki sustav

### 1.2.1 Stanice imunološkog sustava

Imunološki sustav sastoji se od složene i dinamične mreže stanica, tkiva i organa koja služi u obrani organizma od infekcije. Može prepoznati i odstraniti patogene koji iz okoliša prodiru u organizam, ali može i unutar organizma razlikovati i ukloniti tumorske stanice, stanične elemente nastale oštećenjem ili smrću stanice i druge štetne tvari. Imunološki odgovor temelji se na ključnim mehanizmima koji otkrivaju strukturalna obilježja patogena i razlikuju ih od stanica domaćina. Imunološki sustav podijeljen je u dva dijela: urođeni imunološki sustav i stečeni imunološki sustav, i obje komponente sudjeluju u suzbijanju patogenih prijetnji. Urođeni imunološki sustav predstavlja prvu liniju obrane. Urođeni imunološki odgovor prvenstveno ostvaruju granulociti / polimorfonuklearni leukociti (neutrofili, bazofili i eozinofili), dendritičke stanice (eng. DC, *Dendritic Cells*), makrofazi, mastociti i prirodne stanice ubojice (eng. NK, *Natural Killer cells*). Obrambeni mehanizmi održani su biološki aktivnim molekulama pristnim u izvanstaničnim odjeljcima (npr. proteini komplementa) ili izlučenim iz stanica nakon aktivacije (npr. citokini i kemokini). Neutrofili su najzastupljeniji tip polimorfonuklearnih leukocita. Oni igraju bitnu ulogu u urođenom imunitetu oslobađanjem citokina, koji pojačavaju upalnu reakciju. Jedna od važnih funkcija makrofaga je fagocitoza, kojom se uklanjaju ostarjele i/ili mrtve stanice i stanični ostatci. Druga važna uloga makrofaga je prezentacija antigena T limfocitima, koja premošćuje urođeni i stečeni imunološki sustav. Također, dendritičke stanice nakon što budu aktivirane patogenima, predstavljaju njihove antigene T limfocitima kako bi pokrenule i oblikovale stečeni imunološki odgovor (37). T limfociti glavne su stanice stečenog imuniteta i igraju glavnu ulogu u imunološkom odgovoru posredovanom stanicama. Oni na površini stanice nose biljege kojima je definiran njihov imunofenotip (eng. CD, *Clusters of Differentiation*). CD8<sup>+</sup> T limfociti, također poznati kao citotoksični T limfociti, identificiraju specifične antigene koje predstavljaju molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (eng. MHC, *Major Histocompatibility Complex*). CD4<sup>+</sup> T limfociti, također poznati kao pomoćnički T limfociti, pomažu u imunološkim odgovorima poput sazrijevanja B limfocita u plazma stanice i memorijske B limfocite, proizvodnjom

citokina koji mobiliziraju i aktiviraju ostale stanice imunološkog sustava (38). Regulatorni T limfociti poznati su i kao supresijski T limfociti i glavna funkcija im je smanjiti imunost posredovanu T limfocitima. Otkriće da CD4<sup>+</sup> T limfocite mogu karakterizirati različite "citokinske palete" dovelo je do pojma T1 i T2 polarizacije. Polarizacija T limfocita ima funkcionalne posljedice jer su T1 citokini oni najprikladniji za sudjelovanje u spektru imunoloških odgovora usmjerenih na uništavanje stanica zaraženih unutarstaničnim patogenima, dok su T2 citokini specijalizirani za razvoj imunoloških mehanizama koji su učinkoviti protiv izvanstaničnih patogena (39).

Poput T limfocita, ovisno o mikrookruženju, i makrofazi pokazuju različite funkcionalne fenotipove. Proupalni (M1) fenotip i protuupalni / reparatorni (M2) fenotip (40). Ovisno o prirodi podražaja, dolazi do proizvodnje proupalnih citokina i antimikrobnih čimbenika ('klasična aktivacija' ili M1 polarizacija) ili stvaranja protuupalnih i tkivnih faktora za remodeliranje koji su kritični za razrješenje upale i obnavljanje tkiva ('alternativna aktivacija' ili M2 polarizacija) (41).

Zaključno, urođeni i stečeni imunitet međusobno surađuju i održavaju homeostazu organizama. Iako pokretanje stečenog imunološkog odgovora ovisi o urođenom imunitetu, aktivirane stanice stečenog imuniteta pojačavaju djelovanje urođenog imunološkog odgovora. Zajedničko djelovanje ovih dvaju dijelova imunološkog sustava omogućuje učinkovit imunološki odgovor i obranu domaćina.

## 1.2.2 Receptori urođenog imunološkog sustava

Urođeni imunološki odgovor je evolucijski očuvan i nespecifičan na antigen te pokreće akutne upalne reakcije kao odgovor na vanjske čimbenike. U potpunosti je receptorima za prepoznavanje staničnih obrazaca (eng. PRRs, *Pattern Recognition Receptors*), izraženih na raznim stanicama, koji vežu strukturne elemente pojedinih patogena i potiču proizvodnju i oslobađanje antimikrobnih i proupalnih izvršnih molekula (42).

Prema lokalizaciji u staničnoj strukturi, PRR-e možemo podijeliti u tri glavne skupine: citoplazmatski (eng. NLRs, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)-Like Receptors*; RLRs, *Retinoic acid-Inducible Gene-1 (RIG-I)-Like Receptors*),

transmembranski – izraženi na površini stanice (eng. TLRs, *Toll-Like Receptors*; CLR, *C-type Lectin Receptors*) i topivi izvanstanični receptori (eng. *soluble sPRR*), među koje pripadaju receptori sa sposobnošću aktiviranja komplementa (C-reaktivni protein), oni koji komplement ne aktiviraju (serumski amiloidni protein) i same komponente komplementa (C3) (43).

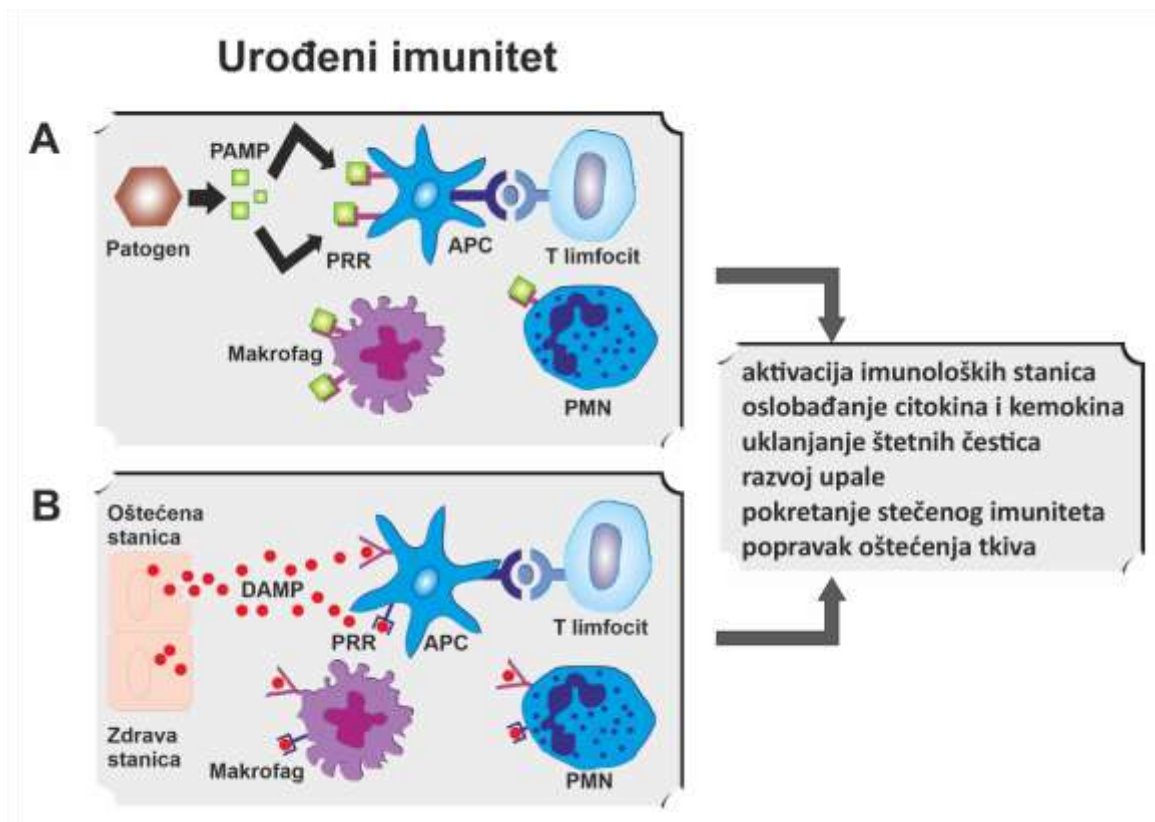
Urođeni imunološki odgovor u velikoj je mjeri pokrenut putem PRR-a izraženih na stanicama urođene imunosti koje uključuju makrofage i dendritičke stanice. Također, epitelne stanice, endotelne stanice i fibroblasti imaju izraženu PRR aktivnost, čime doprinose djelovanju urođenog imuniteta (44). Nakon aktiviranja vezanjem patogenih obrazaca, PRR-i započinju različite funkcije kao što su: opsonizacija patogena i pokretanja djelovanja sustava komplementa, uklanjanje patogena fagocitozom ili aktiviranje unutarstaničnih signalnih putova koji posreduju u proizvodnji i izlučivanju proupalnih izvršnih molekula (45). Opsonizaciju, postupak kojim fagociti označavaju patogen za proces uvlačenja u stanicu i proces uklanjanja, pokreću topivi izvanstanični PRR-i koji čine humoralni krak urođenog imunološkog sustava (43). Vezanje liganda pomoću topivih sPRR-a aktivira putove humoralnog imuniteta kao što je sustav komplementa. Urođeni imunološki sustav nadalje sadrži nekoliko PRR-a vezanih na membranu, koji su izraženi na staničnoj površini makrofaga i neutrofila, i koji su izravno uključeni u posredovanje fagocitoze vezanih patogena. Pored mehanizama odgovornih za fagocitozu, razni transmembranski i citoplazmatski PRR-i vežu strukturne elemente patogena kako bi pokrenuli stanični upalni odgovor. To uključuje aktivaciju unutarstaničnih signalnih putova čija je krajnja točka transkripcijska regulacija gena koji kontroliraju proizvodnju proupalnih citokina i kemokina (37).

### 1.2.3 Imunološki dogovor

Urođena komponenta imunološkog prepoznavanja temelji se na sustavu prepoznavanja koji je specifičan za pojedinu vrstu patogena. Nakon aktiviranja, receptori za prepoznavanje patogenu pridruženih obrazaca (eng. PAMPs, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) i molekula iz nepatogenog izvora koji su oslobođeni iz oštećenih stanica, takozvanih molekularnih obrazaca povezanih s oštećenjem (eng. DAMPs,



Damage Associated Molecular Patterns) mogu pokrenuti tri glavne vrste odgovora: fagocitozu, upalu i sazrijevanje stanica koje predočuju antigen (46). Pokretanje staničnog upalnog odgovora putem PRR-a uključuje aktivaciju unutarstaničnih signalnih putova čija je krajnja točka regulacija transkripcije gena za proteine koji mijenjaju izvršne funkcije i unutarstanične procese. Nadalje, PRR-i kontroliraju proizvodnju proupalnih citokina i drugih biološki aktivnih molekula koje se izlučuju u mikrookoliš i utječu na stanični odgovor okolnih imunoloških stanica (37). Dakle, uz sposobnost pokretanja procesa uključenih u akutnu obranu domaćina (citokinska kaskada), svojom sekundarnom aktivacijom pokreću daljnje kaskade upalotvornih citokina te kostimulirajućih i prijanjajućih molekula (47). Primjer imunološkog odgovora putem PRR-a prikazan je na Slici 1.



**Slika 1.** Imunološki odgovor putem receptora za prepoznavanje obrazaca. Preuzeto i prilagođeno iz (48) uz dozvolu Copyright Clearance Center (<https://www.copyright.com/>)

(A) Infekcija patogenima (bakterijama ili virusima) uzrokuje oslobađanje njihovih strukturnih elemenata PAMP-ova koji se vežu na PRR-e na imunološkim stanicama i potiču urođeni imunološki odgovor koji je

popraćen upalom, aktivacijom stečenog imuniteta i procesima uklanjanja štetnih mikroorganizama i omogućavanjem popravka oštećenja tkiva. **(B)** Slični događaji odvijaju se kada dolazi do smrti ili oštećenja stanica te oslobađanja molekula iz nekrotičnih stanica, koje su obično skrivene unutar stanice. U izvanstaničnom prostoru, ovi DAMP-ovi se mogu vezati za PRR-e i izazvati imunološki odgovor promicanjem oslobađanja proupalnih medijatora i aktiviranjem imunoloških stanica. Imunološke stanice koje sudjeluju u tim procesima uključuju antigen-prezentirajuće stanice (APC), poput dendritičkih stanica i makrofaga, kao i T limfocite i polimorfonuklearne leukocite (PMN).

Model prepoznavanja mikrobnog obrasca predložio je Charles Janeway Jr. koji opisuje dvije značajke urođenog imuniteta: sposobnost razlikovanja infektivnih molekula od vlastitih i sposobnost aktiviranja stečenog imunološkog odgovora na strane molekule (49). Urođena imunost temelji se na anatomskim, fiziološkim, fagocitnim zaprekama i na upali. U dišnom sustavu, lokalnu obranu predstavlja epitel koji blokira ulazak udahnutih patogena i štetnih čestica, a sustavna urođena imunost posredovana je cirkulirajućim imunološkim stanicama. U trenutku kada epitelna barijera bude probijena, dolazi do aktivacije rezidencijalnih alveolarni makrofaga, koji su senzori patogena i potiču regrutiranje imunoloških stanica u alveolama (50). Oni će koristeći receptore za prepoznavanje uzorka (PRR-e), pokrenuti niz signalnih putova. Rezultat ovog procesa je nastanak specifičnog, ligandom uvjetovanog, citokinsko-kemokinskog okruženja koje uzrokuje klasičnu proupalnu (M1) i alternativnu protuupalnu (M2) aktivaciju makrofaga. Proupalni makrofazi proizvode veće razine upalnih posrednika koji djeluju destruktivno na patogene, a protuupalni makrofazi pokazuju povećanu sposobnost čišćenja mrtvih ili apoptotskih stanica fagocitozom te stvaraju protuupalne citokine i posrednike popravka i preinake tkiva (51). Citokini, kemokini i komplementarni faktori oslobođeni iz aktiviranih epitelnih stanica ili rezidencijalnih makrofaga privlače i aktiviraju izvršne stanice modelirajući lokalni imunološki odgovor (52), a aktivacija PRR-a specifičnim ligandima ima izuzetno važnu ulogu tim procesima. Opisane urođene imunološke funkcije proizvodnje proupalnih citokina i kemokina u velikoj mjeri ostvaruju se putem transmemranskih Toll-like receptora (TLR-a).

## 1.3 Toll-like receptori

### 1.3.1 Struktura i stanična lokalizacija TLR-a

Toll-like receptori (TLR) su proteini izraženi na membranama imunoloških i neimunoloških stanica čija aktivacija specifičnim ligandima dovodi do pokretanja signalnih putova koji u konačnici rezultiraju aktivacijom urođenog imunološkog odgovora. Izražaj TLR-a dokazan je na površini dendritičkih stanica, mastocita, makrofaga, B limfocita, eozinofila, neutrofila, epitelnih i endotelnih stanica, stanica vezivnog i masnog tkiva, srčanomišićnih stanica i stanica kože (47). Izraženi su i na tumorskim stanicama, uključujući stanice karcinoma pluća (53). Alveolarne epitelne stanice tipa II također imaju izražene TLR-e (54) i mogu povećati izražaj tih receptora na svojoj površini u uvjetima infekcije (55). TLR1 do TLR10 nalaze se na epitelnim stanicama bronha i na površini alveolarnih makrofaga te oslobađaju biološki aktivne molekule nakon njihove aktivacije (54), (56).

Stanična lokalizacija različitih TLR-a povezana je s molekularnim obrascima njihovih liganda. TLR1, TLR2, TLR4, TLR 5 i TLR6 nalaze se na staničnoj površini i premještaju se u unutarstanične organele nakon aktivacije odgovarajućim ligandima. U te molekule, koje se vežu za Toll-like receptore, pripada širok spektar sastavnica stanične stijenke bakterija i gljivica, bakterijskih i virusnih nukleinskih kiselina, bakterijskih lipopeptida i proteina i virusnih proteinskih omotača (57). TLR3, TLR7 i TLR9, koji su uključeni u prepoznavanje nukleinskih kiselina, izraženi su na unutarstaničnim organelama (58). Članovi obitelji TLR-a prepoznaju specifične obrasce sastavnica mikroorganizama i razlikuju se upravo po toj specifičnosti prema vezujućoj molekuli. TLR2 je ključan za prepoznavanje mikrobnih lipopeptida; TLR1 i TLR6 surađuju s TLR2 kako bi prepoznali razlike između triacilnih i diacilnih lipopeptida, a TLR4 je receptor za lipopolisaharid. TLR9 je ključan za prepoznavanje CpG DNA; TLR3 djeluje u prepoznavanju virusne dsRNA, dok su TLR7 i TLR8 uključeni u prepoznavanje virusne ssRNK. TLR5 prepoznaje flagelin koji je strukturna sastavnica bičastih bakterija (59).

TLR-i pripadaju obitelji transmembranskih glikoproteinskih receptora koji imaju izvanstaničnu, transmembransku i citoplazmatsku građevnu domenu (60). TLR-i postoje na plazmatskoj membrani kao monomeri, a dimerizacija monomera, bilo homo-

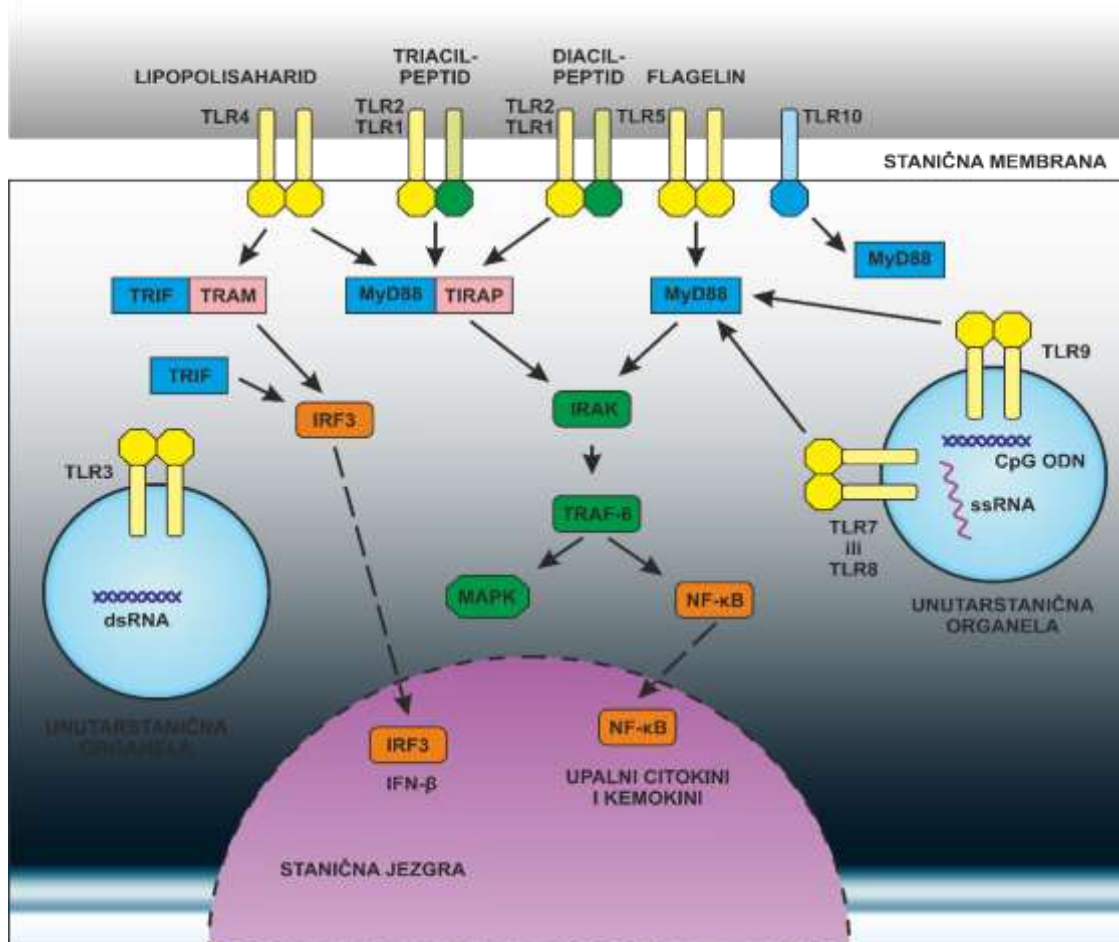
dimerizacija ili hetero-dimerizacija, neophodna je za pokretanje signalizacije (57). Svaki TLR strukturiran je poput potkove s promjenjivim brojem ponavljanja bogatih leucinom (eng. LRRs, *leucine rich repeats*) na N-završetku koji je okrenut izvanstaničnom matriksu, ako je smješten na staničnoj membrani, odnosno koji je okrenut prema lumenu ako je smješten na unutarstaničnim organelama. LRR je proteinski strukturni motiv sastavljen od 20-30 aminokiselinskih ponavljanja koja sadrže usklađeni slijed LXXLXLXXNXL, gdje L može biti ostatak leucina, izoleucina ili valina, N je ostatak asparagina, cisteina ili treonina, a X može biti bilo koja aminokiselina. Funkcija mnogih LRR domena je pružiti strukturni okvir za interakcije protein-protein.

Unutarstanična ili citoplazmatska domena označena je kao Toll / IL-1R (TIR) jer dijeli sličnost s interleukin-1 receptorom (IL-1R). TIR je uključen u posredovanje međudjelovanja između TLR-a i adaptornih proteina i pretvorbe signala, dok LRR služi prepoznavanju liganada (61). TLR-i koriste svoje citoplazmatske TIR domene kako bi nakon stimulacije receptora pokrenuli unutarstanični signalni odgovor. Tako receptorske TIR domene stvaraju unutarstaničnu signalnu platformu za mobilizaciju adaptornih proteina koji posreduju taj signalni odgovor. Predstavljaju primjer signalizacije specifične za mjesto i mogu aktivirati različite transkripcijske odgovore ovisno o tome koji adaptorni protein koriste (62). Tu spadaju MyD88 (eng. *myeloid differentiation primary-response protein 88*), TIRAP (eng. *Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* ) i TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (63). TLR adaptorni proteini doprinose raznolikosti signalnih odgovora izazvanih Toll-like receptorima.

### 1.3.2 TLR signalni put

Toll-like receptori predstavljaju ključni element urođenog imunološkog odgovora. Prepoznaju širok spektar komponenata izvedenih iz patogena ili oštećenih stanica, te koristeći svoje citosolne TIR domene pokreću unutarstanične signalne puteve. Dosadašnjim istraživanjima utvrđena su dva klasična signalna puta TLR / IL-1R, signalni put ovisan o MyD88 i signalni put neovisan o MyD88 (64). Nakon vezanja liganada, TIR domene receptora se dimeriziraju i podliježu promjeni prostornog razmještaja koja je potrebna za mobilizaciju signalnih adaptornih molekula. Krajnja točka tog puta je

aktivacija transkripcijskih čimbenika koji potiču gensku ekspresiju proupalnih citokina koji se oslobađaju u mikrookoliš i pokreću upalni odgovor. MyD88 funkcionira kao adaptorni protein koji povezuje TIR domenu s nizvodnim signalnim molekulama, a nakon stimulacije receptora, MyD88 se premješta na citoplazmatsku TIR domenu. Time olakšava vezanje IRAK4 s receptorskim kompleksom koji aktivira IRAK1 i omogućuje vezanje TRAF6. Međudjelovanje gore spomenutog kompleksa s TGF- $\beta$ -aktiviranom kinazom izaziva oslobađanje nukleranog faktora NF- $\kappa$ B (58). Tim putem NF- $\kappa$ B se oslobađa svog inhibitora, premješta se u jezgru i pokreće izražaj gena za upalne citokine. Ovim, takozvanim signalnim putem ovisnim od MyD88 proteinu pokreće se aktivacija TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 i TLR9. Drugi adaptorni protein koji sadrži TIR domenu je TIRAP koji posreduje MyD88-ovisni put putem TLR2 i TLR4 (58). MyD88 uključen je u većinu signalnih putova pokrenutih TLR-ima, s izuzetkom TLR3 i djelomično TLR 4, koji signaliziraju putem TRIF-a, i tako pokreću signalni odgovor neovisan o MyD88 (65). Shematski prikaz signalnog puta Toll-like receptora prikazan je na Slici 2.



**Slika 2.** Shematski prikaz signalnog puta Toll-like receptora (TLR). Preuzeto i prilagođeno iz (66) uz dozvolu The Crankshaft Publishing's (<http://what-when-how.com/copyright-information/>).

TLR1, TLR2, TLR4, TLR 5 i TLR6 nalaze se na staničnoj površini i vežu širok spektar sastavnica stanične stijenke bakterija i gljivica, bakterijskih i virusnih nukleinskih kiselina, bakterijskih lipopeptida i proteina i virusnih proteinskih omotača. TLR2 (u kombinaciji s TLR1 ili TLR6) i TLR4 koriste MyD88 i TIRAP kao primarne adaptorne proteine za aktiviranje transkripcijskog faktora NF-κB i pokreću sintezu upalnih citokina. Također, TLR4 koristi TRIF i TRAM za aktiviranje regulacijskog faktora IRF3 i signalnog odgovora neovisnog o MyD88. TLR3, TLR7 i TLR9, koji su uključeni u prepoznavanje nukleinskih kiselina (CpG ODN, ss RNA, ds RNA), izraženi su na unutarstaničnim organelama i aktiviraju interferonski put. TLR3 koristi TRIF, ali ne i TRAM, za aktiviranje interferonskog puta.

TLR-ovi 5, 7, 8 i 9 pokreću stvaranje upalnih citokina i interferona signalnim putem ovisnim od MyD88. Nakon stimulacije tih receptora, MyD88 se premješta na citoplazmu, aktivira IRAK i omogućuje vezanje TRAF6 i aktiviranje NF-κB, te pokreću sintezu upalnih citokina.

\* MyD88 (eng. myeloid differentiation primary-response protein 88), TIRAP (eng. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β), TRAM (TRIF-related adaptor molecule), IFR3 (*Interferon regulatory factor 3*), IRAK (eng.

IL-1R-associated kinase), TRAF6 (eng. tumour-necrosis factor (TNF)-receptor-associated factor 6), CpG ODN (eng. CpG Oligodeoxynucleotide), ss RNA (eng. single-stranded ribonucleic acid), ds RNA (eng. double-stranded ribonucleic acid).

Aktivacija TLR-ova i posljedični prijenos signala pokreću kaskadu transkripcijskih čimbenika, što dovodi do aktivacije i ekspresije proupalnih gena i sintezu upalnih citokina koji sudjeluju u usmjeravanju odgovora na antigene, stvaranje imunološkog pamćenja i reakciju na oštećenje tkiva. Ti signalni putevi omogućuju obranu epitela protiv uzročnika infekcije, posreduju u aktiviranju stečenog imunološkog odgovora pokretanjem aktivacije antigen-prezentirajućih stanica, potiču izražaj prijanjajućih molekula na leukocitima tijekom razvoja upale i doprinose učinkovitosti fagocitoze (67). Također sudjeluju u procesima umnožavanja stanica, preživljavanja i stanične smrti te posljedično u preinakama i popravcima tkiva (68). Upravljanje upalnim / imunološkim odgovorom može se značajno izmijeniti promjenama u TLR signalizaciji i njihova neodgovarajuća ili neregulirana aktivacija može izazvati ozbiljne sistemske poremećaje. Zbog svoje složene i važne funkcije u regulaciji imunološkog odgovora i održavanju tkivne homeostaze, TLR signalni putevi prepoznati su kao mogući terapijski ciljevi kod mnogih upalnih i malignih bolesti (69).

#### **1.4 Poremećaj imunološkog odgovora - poveznica KOPB-a i karcinoma pluća**

Mehanizmi koji povezuju nastanak karcinoma pluća kod osoba s KOPB-om još uvijek su nedovoljno poznati. Rane hipoteze predlažu da pacijenti s KOPB-om imaju veće nakupljanje karcinogena u dišnim putovima (70). Druge hipoteze povezuju karcinom pluća sa podležećim emfizemom i pregradnjom pluća (71). Novije studije pokazale su da je urođeni imunološki odgovor uključen i u KOPB i karcinom pluća. Pretpostavlja se da sistemski upala, kao posljedica pretjerane osjetljivosti urođenog imunološkog sustava, povezana s preinakama u plućima koje dovode do KOPB-a, potencijalno dovodi do karcinoma pluća (72). Bitna uloga upale u razvoju karcinoma je oštećenje DNA, sprječavanje popravka DNA i funkcionalna inaktivacija gena za supresiju tumora uzrokovana velikom proizvodnjom reaktivnih spojeva od strane upalnih stanica (71). Te promjene uparene s upalnim mikrookolišem i procesom obnavljanja bitni su čimbenici za razvoj karcinoma kod pušača. Oštećenje epitelnih stanica pluća primarnim (toksičnim i karcinogenim) i sekundarnim (posredovanim upalnim odgovorom) učincima duhanskog dima ima značajan utjecaj na okolno tkivo. Kronična upala, uzrokovana izlaganjem duhanskom dimu, postavljena kao mogući temeljni mehanizam povezivanja karcinoma pluća i KOPB-a, podupire staru Virchowljevnu teoriju da se karcinom javlja na mjestima kronične upale (73). Međutim, dokazano je da se karakteristike imunoloških stanica specifičnih za KOBP razlikuju od onih prisutnih kod karcinoma pluća. Kod bolesnika sa KOBP-om aktivirani su M1 prouplani makrofazi koji uzrokuju polarizaciju prema T1 fenotipu pomoćničkih T limfocita (74). Ovaj citotoksični T1 fenotip čini se pogodnim za razvoj tumorskog mikrookoliša, no ne javlja se kod solidnih tumora kod kojih je prisutan T2 fenotip kojeg aktiviraju M2 makrofazi (74).

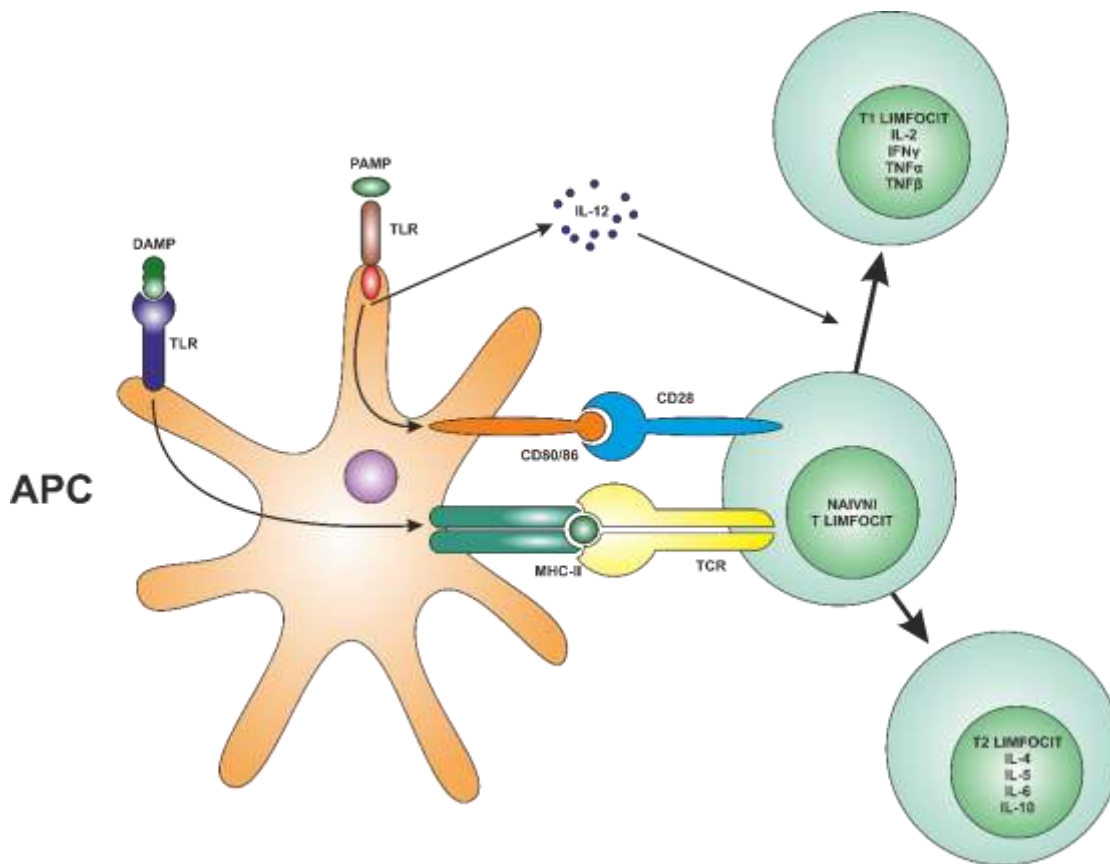
Središnje stanice u patofiziologiji KOPB-a, makrofazi i neutrofili, nakupljeni su u dišnim putovima i plućnom parenhimu (75). Kao odgovor na duhanski dim, nadražujuće tvari i infekciju, makrofazi oslobađaju upalne posrednike i luče enzime za razgradnju proteina (76). Razaranjem izvanstaničnog matriksa oslobađaju se aktivacijski fragmenti koji potiču upalu kemotaktičkim privlačenjem neutrofila (77) što dovodi do oštećenja pluća oslobođenim slobodnim radikalima i biološki aktivnim molekulama (78). Pokretanju razvoja tumora ne doprinosi samo oštećenje DNA oslobođenim radikalima, već oslobođeni proteolitički enzimi mogu izazvati proliferaciju, angiogenezu i migraciju



potrebnu za napredovanje tumora (79). Sve ovo govori u prilog tome da u bolesnika s KOPB-om kroničnu upalu prati pokretanje neispravnih imunoloških odgovora koji doprinose pogoršanju upalnog mikrokoliša i težini bolesti (22), a njihov suzbijen urođeni imunitet praćen je povećanom osjetljivošću na razvoj karcinoma (80).

U karcinomu pluća važnu ulogu imaju stanice imunološkog sustava koje infiltriraju tkivo tumora, tzv. tumor-infiltrirajuće imunološke stanice, a posebno T limfociti. Kako se razvijaju, T limfociti mogu postati polarizirani i ograničeni na stvaranje T1 (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) ili T2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) palete citokina. Razvoj neodgovarajuće polariziranog odgovora T limfocita može dovesti do neučinkovitog imunološkog odgovora, a čimbenici koji potiču polarizaciju i utječu na način na koji imunološki sustav reagira na patogene su kritični za razvoj upalnih i malignih bolesti. U uvjetima kronične infekcije ili produženog predočenja tumorskih antigena, kao posljedica razvoja tumora, potreban je fini balans u kontroli aktivacije T limfocita. Naime, oštećenje tkiva može djelovati na aktivaciju T limfocita i time onemogućiti njihove izvršne funkcije (81). Aktivacija T limfocita i njihova citotoksična funkcija strogo su regulirani nizom imuno-regulatornih receptor-ligand međudjelovanja ili imunološkim kontrolnim točkama. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su imunološke kontrolne točke (npr. kontrola citotoksične aktivnosti T limfocita ekspresijom PD1 receptora programirane smrti (eng. PD, *Programmed Death*)) poremećene u KOPB-u (82).

Prvi korak u urođenom imunološkom odgovoru je aktivacija receptora urođene imunosti, poput TLR-a, koji vežu molekule otpuštene iz patogena ili oštećenih stanica (PAMP-ovi i DAMP-ovi), te potonja signalizacija koja u konačnici vodi do oslobađanja nuklearnog faktora (NF)- $\kappa$ B i aktivacije ekspresije proupalnih gena. Smatra se da su izmijenjeni signalni putovi NF- $\kappa$ B neke od mogućih temeljnih mehanizama kojima upala doprinosi malignoj pretvorbi stanica (83). Nekontrolirana aktivacija NF- $\kappa$ B transkripcijskog faktora može imati ključnu ulogu u tom procesu s obzirom na dokaze da NF- $\kappa$ B aktivirane antigen-prezentirajuće stanice poput makrofaga, putem TLR signalnog puta, otpuštaju biološki aktivne molekule u blizini stanica respiratornog epitela, uzrokuju njihovo oštećenje i stvaraju specifični upalni mikrokoliš (84). Uloga TLR-a u kontroli imunološkog odgovora i stvaranju specifičnog upalnog mikrokoliša prikazana je na Slici 3.



**Slika 3.** Uloga TLR-a u kontroli imunološkog odgovora i stvaranju specifičnog upalnog mikrookoliša. Preuzeto i prilagođeno iz (85) uz dozvolu Copyright Clearance Center (<https://www.copyright.com/>).

TLR prepoznaju ugrozu prepoznavanjem specifičnih molekula povezanih sa patogenom (PAMP) ili oštećenjem stanice (DAMP). Prepoznavanje PAMP-ova i DAMP-ova putem TLR-a izraženih na antigen-prezentirajućim stanicama (APC) povećavaju ekspresiju molekula na površini stanica kojima je definiran njihov imunofenotip (CD) i antigena tkivne podudarnosti (MHC). TLR također pokreću ekspresiju upalnih citokina poput interleukina, interferona i tumor-nekrotizirajućeg faktora i njihovih receptora, koji potiču procese povezane sa sazrijevanjem antigen-prezentirajućih stanica i aktivacijom limfocita T. Ovi procesi doprinose polarizaciji limfocita T koji se time ograničavaju na stvaranje T1 (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ ) ili T2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) palete citokina i stvaranju specifičnog upalnog mikrookoliša.

Stanice urođenog imunološkog sustava sudjeluju u popravku oštećenja oslobađanjem upalnih medijatora. No, ti upalni medijatori, iako su neophodni za imunološki odgovor tijekom ozljede ili infekcije, povezani su s povećanim rizikom za razvoj karcinoma (86).

Rad Wautersa i suradnika prvi put je pokazao da se karcinomi pluća nastali u bolesnika s KOPB-om razlikuju od onih bolesnika bez KOPB-a zbog prisutnosti specifičnog upalnog tumorskog mikrookoliša (87). Studija koju su proveli Mark i sur. pokazala je da patogeneza KOPB-a i nesitnostaničnog karcinoma pluća (NSCLC) uključuje neuravnotežen imunološki odgovor. Prisutnost KOPB-a i povećana polarizacija limfocita T prema T1 fenotipu utječe na tumorski mikrookoliš i ekspresiju imunoloških kontrolnih točaka u bolesnika s NSCLC-om. Naime, T1 paleta citokina koji prožimaju tumorski mikrookoliš u prisutnosti KOPB-a utječe na povoljniji odgovor na liječenje imunološkim inhibitorima kontrolnih točaka (eng. ICI, *Immune Checkpoint Inhibitors*) bolesnika s NSCLC-om (88). To dokazuje da tipičan upalni mikrookoliš koji se opaža kod KOPB-a može utjecati na molekularne mehanizme koji su odgovorni za karcinogenezu, ali utjecaj upalnih putova na razvoj i napredovanje karcinoma kod bolesnika s KOPB-om još uvijek nije jasan.

Neppravilna regulacija imunološkog odgovora i prisutnost kronične upale čine se ključnim događajima za razvoj karcinoma pluća u prisutnosti KOPB-a. Upalni putovi vjerojatno sadrže dodatne inačice gena imunološkog sustava povezanih s karcinomom pluća koje se razlikuju ovisno o prisutnosti KOPB-a. Trenutna literatura naglašava ulogu TLR signalnog puta u razvoju dugoročnih promjena imunološkog odgovora i smjera kojim se određena bolest razvija, te činjenicu da polimorfizmi u TLR genima mijenjaju osjetljivost pojedinca na stanja u kojima je imunološki sustav nedostatan ili oslabljen (89). Doprinos koji geni imaju u razvoju karcinoma pluća značajno se razlikuje među pojedincima koji imaju i onima koji nemaju sklonost za razvoj KOPB-a (90). Studije genetskog mapiranja identificirale su nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP-ova) koji su povezani i s KOPB-om i karcinomom pluća. Mnogi od njih nalaze se u genima za receptore urođene imunosti i upalne citokine. Funkcionalni SNP-ovi u nekima od ovih gena mijenjaju rizik za razvoj KOPB-a i/ili karcinoma pluća i vjerojatno predstavljaju sastavnicu genetske osjetljivosti za obje bolesti.

## 1.5 Uloga polimorfizma u genima za Toll-like receptore u razvoju upalnih i malignih bolesti

Raznolikost genetskog materijala, koja se zasniva na polimorfizmima, omogućuje međusobno razlikovanje pojedinaca, ali i pronalaženje gena odgovornih za nastanak patoloških stanja. Svaka promjena strukture DNA koja se odnosi na pojavu više od jedne genske inačice na istom položaju na kromosomu, uočena u više od 1% populacije, naziva se genski polimorfizam (91).

Nukleotidna različitost (eng. *nucleotide diversity*) je prosječan broj nukleotida koji razlikuje dvije jedinke i procijenjena je na između 0,1% i 0,4% od ukupnog broja parova baza (92). Procesom mutacije mijenja se redoslijed nukleotida, a promjene u jednom ili više nukleotida predstavljaju točkaste mutacije. Nastaju mehanizmima pogrešne supstitucije baza (genske promjene koje najčešće obuhvaćaju samo jedan nukleotidni par), pomakom okvira čitanja (eng. *frameshift*) nastale uslijed adicije (umetanje jednog ili dva nukleotida) ili delecije (gubitak jednog ili dva nukleotida).

Polimorfizmi u kojima jedan od nukleotida (A, T, G ili C) bude zamijenjen drugim nazivaju se polimorfizmi jednog nukleotida (eng. SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) i posljedično mijenjaju slijed DNK (93). Pojavljuju se s učestalošću od barem 1% u populaciji, najčešći su tip varijabilnosti između dva slijeda DNA i obuhvaćaju 90% ukupnog broja varijabilnosti između dva genoma (94). SNP-ovi imaju dva alela, a kombinacija alela definira haplotip i predstavlja zamjenu jedne baze za drugu. Za pojedinačni SNP, jedan je označen kao glavni (majorni) alel, a drugi kao minorni alel na temelju njihove uočene učestalosti u općoj populaciji. Budući da su ljudi diploidni (kromosomi su majčinog i očevog podrijetla), u odabranom SNP-u osoba može imati jedan od nekoliko genotipova: heterozigotni ili homozigotni za majorni ili minorni alel (95). Prema rezultatima cjelogenomskog sekvenciranja, SNP se javlja jednom u svakih 200 - 1000 nukleotida (96). Dije se u dvije grupe prema tome kakav utjecaj imaju na fenotip pojedinca. Funkcionalne ili nesinonimne točkaste mutacije su one koje utječu na promjene u aminokiselinskom slijedu i mogu dovesti do promjena u strukturama i funkciji proteina i razlike u fenotipu (97). Kod čovjeka je između 3% i 5% svih točkastih mutacija funkcionalno (98). Neutralne ili sinonimne točkaste mutacije su one koje ne uzrokuju promjenu u izrezivanju gena i ne utječu na mRNA te time ne uzrokuju promjenu fenotipa.

S obzirom na činjenicu da polimorfizmi mogu djelovati na ishod aktivacije različitih signalnih putova važnih za prilagodbu organizma, ta genetička raznolikost mogla bi objasniti pojedinačne razlike u urođenim imunološkim odgovorima. Nekoliko epidemioloških studija ističe činjenicu da polimorfizmi u TLR genima mijenjaju osjetljivost pojedinaca na razvoj bolesti u čijoj podlozi se nalazi poremećeni imunitet. Moguća uloga genetskih inačica TLR obitelji proučavana je uglavnom kod imunološki posredovanih i upalnih bolesti poput artritisa, sistemskog eritemskog lupusa, astme i atopijskog dermatitisa, kao i kod kardiovaskularnih bolesti (99). Polimorfizmi u TLR-ima mogu igrati ulogu u izmjeni urođenih odgovora kod ovih bolesti jer manjkavi ili promijenjeni proteini uključeni u signalne putove mogu dovesti do neprikladnog imunološkog odgovora.

Genetske studije definirale su ulogu TLR polimorfizama u sklonosti za razvoj, napredovanje i ishod upalnih bolesti poput legioneloze, lajmske borelioze i sistemskog lupusa(100),(101),(102). Provedena su funkcionalna istraživanja tih polimorfizama i ispitan utjecaj na stanični imunološki odgovor. Rezultati tih studija su pokazali da prisutnost SNP-ova može utjecati na sposobnost vezanja receptora i oštećenja njihovog unutarstaničnog transporta te rezultirati izmijenjenim međudjelovanjem signalnih i adaptornih proteina (103).

Polimorfizmi gena koji kodiraju TLR-e i molekule signalnog puta TLR-a mogu promicati razvoj infekcije ili povećati proizvodnju proupalnih citokina zbog određenih molekularnih promjena u TLR signalnom putu (103). Primjer međuodnosa TLR polimorfizama i razvoja bolesti opisan je za polimorfizme D299G i T399I u TLR4. Ta dva SNP-a mijenjaju proteinsku sekvencu izvanstanične domene receptora i potvrđena je njihova povezanost sa smanjenom reaktivnošću na endotoksin (104) i većom učestalošću bolesti za koje se smatra da su posredovane endotoksinom, poput sindroma sistemskog upalnog odgovora, sindroma akutnog respiratornog distresa i bolesti dišnih putova (105). Nesinonimni TLR5 SNP R392X uključuje stop-kodon u izvanstaničnoj domeni receptora, koji dokida aktivaciju receptora i uzrokuje smanjeni odgovor na flagelin (100) i čini se da smanjuje sklonost za razvoj autoimune bolesti sistemskog eritemskog lupusa (101). Druga studija otkrila je da je I602S kodirajući alel TLR1, koji uzrokuje promjenu aminokiselina u transmembranskom segmentu receptora, povezan sa smanjenom učestalošću gube (106). Funkcionalne analize pokazale su smanjenu funkciju receptora

TLR1 I602S što je rezultiralo smanjenom aktivacijom signalnog puta i smanjenom proizvodnjom proupalnih citokina (107).

TLR signalizacija također potiče popravak i obnovu tkiva poticanjem procesa preživljavanja i sprečavanjem apoptoze epitelnih stanica, mehanizama uključenih i u karcinogenezu (108). Polimorfizmi gena za TLR-e povezani su s različitim malignim bolestima kod ljudi (npr. povezanost SNP-a unutar gena za TLR2 i razvoja karcinoma kolona, SNP-a unutar gena za TLR4 i razvoja karcinoma prostate i karcinoma želuca, SNP-a gena za TLR6 i razvoja ne-Hodgkinovog limfoma, SNP-a gena za TLR9 i karcinoma maternice) (109). Pokazano je da su TLR2, TLR4 i TLR9 prekomjerno ekspimirani u tkivu karcinoma pluća u usporedbi s normalnim plućnim tkivom, te da ekspresija TLR-a može promovirati zloćudnu transformaciju epitelnih stanica, rast tumora i rezistenciju na apoptozu stanica tumora (110). Studija Kurta i suradnika je otkrila da nosioci CT genotipa SNP-a rs4986791 koji je smješten na TLR4 genu imaju povećan rizik za razvoj karcinoma pluća (111). Također, analiza odnosa polimorfizama TLR gena i sklonosti za razvoj karcinoma pluća pokazala je da prisutnost alela T polimorfizma rs7869402 gena TLR4 smanjuje rizik za razvoj karcinoma pluća među pušačima, ali ne i nepušačima (112). Ovi rezultati sugeriraju da genetske inačice TLR-a mogu utjecati na rizik za razvoj karcinom pluća u kontekstu genetske i okolišne interakcije.

Kombinacija nekoliko genetskih polimorfizama u enzimima koji aktiviraju ili deaktiviraju kancerogene tvari duhanskog dima može izmijeniti rizik kroničnih pušača za razvoja KOPB-a i karcinoma pluća (113). Izražaj gena koji su uključeni u regulaciju upale i nekoliko tumor-supresijskih gena smanjen je kod pušača (114), (115) (116). Ovi genetski čimbenici uzrokuju nepravilan odgovor na učinke upale izazvane pušenjem koji su u osnovi razvoja KOPB-a i karcinoma (117). Utvrđeno je da KOPB i karcinom pluća imaju zajedničke polimorfizme gena porijeklom iz putova popravka DNA i upalnog odgovora koji donose sklonost za obje bolesti. Naime, de Andrade i suradnici otkili su da polimorfizmi gena ABCC4 koji kodira ATP-vezujući protein (transporter koji prenosi različite molekule preko unutarstanične membrane i ima ulogu u staničnoj detoksikaciji) i gena PTGS2 koji kodira prostaglandin-endoperoksid sintetazu (ključni je enzim u biosintezi prostaglandina uključenih u upalne procese) povećavaju sklonost za KOPB i karcinom pluća (118).

Ispitivanja su pokazala i negativna i pozitivna regulatorna svojstva TLR-a u karcinogenezi, a te višestruke funkcije mogu ovisiti o odgovarajućem okruženju, vrsti stanice i specifičnim TLR-ovima (86). Stresni uvjeti kao što su hipoksija, nekroza i ozljeda tkiva karakteristični su za mikrookoliš tumora, a tumor ih koristi za mobilizaciju upalnih stanica i poticanje karcinogeneze (119), (30), (120). Ti uvjeti prisutni su i u kroničnim respiratornim bolestima, te utječu na neoplastičnu pretvorbu ometanjem važnih staničnih procesa kao što su obnova tkiva, stvaranje novih krvnih žila i stanična smrt (121), (122). Različita je i ekspresija TLR-a u stanicama epitela dišnih putova, stanicama glatkih mišića dišnih putova i imunološkim stanicama zbog utjecaja mikrookoliša, te može biti različita u aktiviranim i neaktiviranim stanicama, a promjene u ekspresiji TLR-a zamjećene su i različitim fazama bolesti (123). Zaključno, bolest može biti posljedica preosjetljive TLR signalizacije koju aktiviraju bezopasne molekule ili može biti posljedica nedovoljne TLR signalizacije što dovodi do loših obrambenih mehanizama. Otkrivanje načina na koji inačice gena odgovornih za aktivaciju i regulaciju imunološkog odgovora mijenjaju osobine imunološkog sustava mogle bi pomoći da razumijemo utjecaj koji imaju na rizik za razvoj upalnih i malignih bolesti pluća.

## **1.6 Povezanost SNP-a gena za TLR-e sa upalnim medijatorima uključenim u razvoj karcinoma**

Uloga kronične upale i upalnih medijatora (citokina) u karcinogenezi istražuje se još od 19. stoljeća, kada je Virchow dokazao postojanje leukocita u tumorskom tkivu. Smatra se da kronična upala igra važnu ulogu u pokretanju nastanka tumora i pridonosi razvoju oko 25% svih karcinoma (124). Povećana razina upale uočena je kod različitih vrsta karcinoma, uključujući karcinom pluća (120) i proupalni citokini prepoznati su kao temelj za nekoliko bioloških procesa povezanih s razvojem malignih tumora.

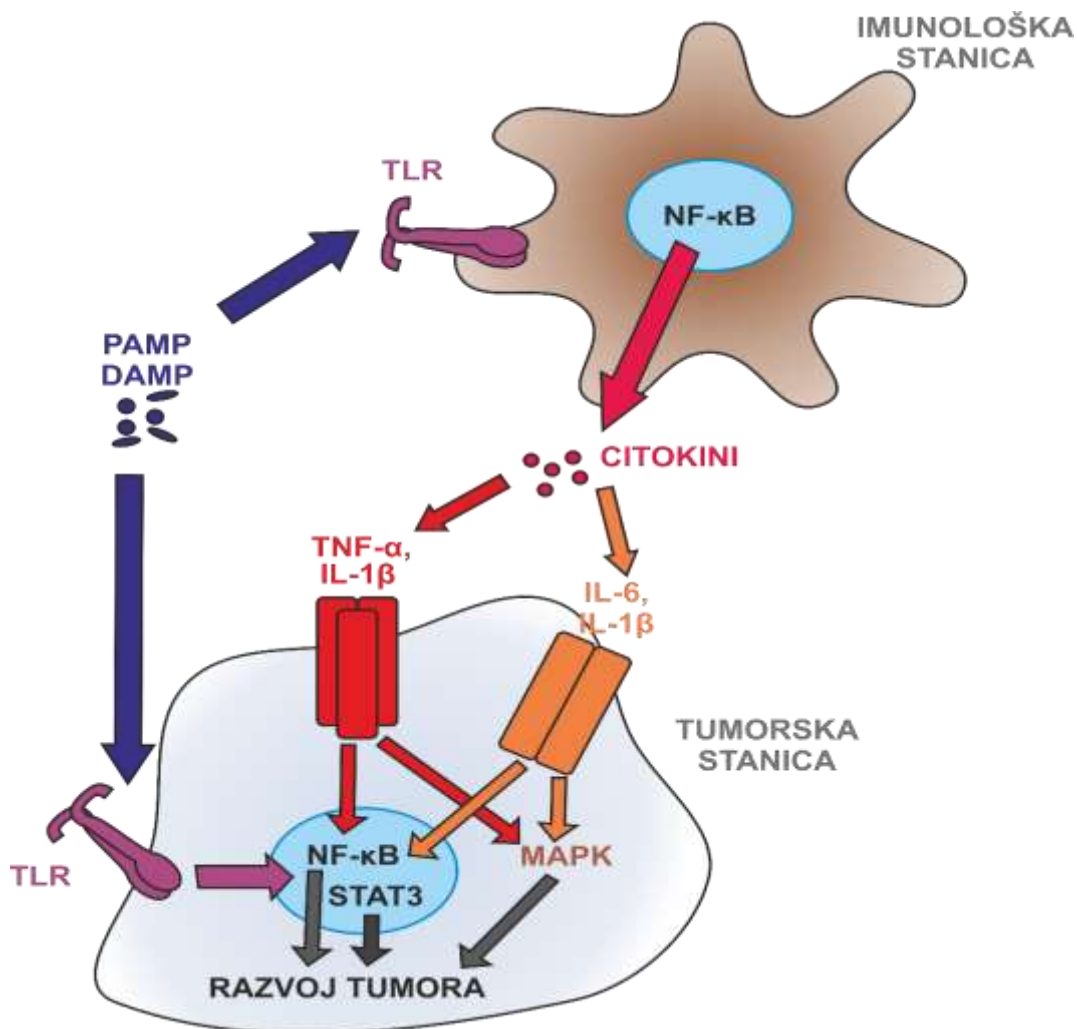
TLR-i pokreću signalne putove kojima se povećava proizvodnja citokina od strane imunoloških stanica. Polimorfizmi u TLR genima mogu pomaknuti ravnotežu između proupalnih i protuupalnih citokina, modulirajući rizik za razvoj infekcije, kronične upale i karcinoma. Dokazi sugeriraju da TLR polimorfizmi utječu na staničnu proizvodnju citokina i moguće drugih važnih imunoloških funkcija koje mijenjaju tijekom upale i razvoja tumora (109).

U mikrookolišu tumora različiti citokini mogu dovesti do suprotnih ishoda u napredovanju tumora, ovisno o vrsti prisutne upale (125). Izražaj gena koji su uključeni u upalne procese, razvoj funkcionalnih razlika među stanicama i njihovo preživljavanje regulirani su većinom putem regulacije aktivacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B. Prijenos signala putem TLR-a rezultira aktivacijom transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, a nepravilna kontrola aktivacije NF- $\kappa$ B može dovesti do upalnih bolesti, kao i do razvoja karcinoma (126). Cherfils-Vicini i suradnici dokazali su vezu između signalnog puta TLR7 i TLR8 te upale i rasta tumora (127), dok je za aktivaciju TLR9 dokazano da potiču urođene i antitumorske imunološke reakcije pokretanjem procesa razgradnje tumorskih stanica (128). Dakle, kronična upala u razvoju tumora djeluje poput noža s dvije oštrice. Dok protuupalni citokini odstranjuju tumorske stanice, aktivacija proupalnih citokina pogoduje nastanku tumorskog mikrookoliša i daljnjem napredovanju tumora (129).

Proupalni citokini poput tumor-nekrotizirajućeg čimbenika alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukina IL-1 $\beta$  i IL-6 sudjeluju u fiziološkim i patološkim odgovorima kao što su upala, imunološki odgovor i razvoj tumora (130), a IL-6 se smatra ključnim antiapoptotičkim čimbenikom za poticanje rasta stanica (131). Signalizacija putem TLR-



a i njihova povezanost sa proizvodnjom proupalnih citokina i razvojem karcinoma prikazana je na Slici 4.



**Slika 4.** Signalizacija putem TLR-a i njihova povezanost sa proizvodnjom proupalnih citokina i razvojem karcinoma. Preuzeto i prilagođeno iz (132) uz dozvolu Copyright Clearance Center (<https://www.copyright.com/>).

Pokretanje imunološkog odgovora vezanjem PAMP-ova i DAMP-ova putem TLR-a stvara specifično okruženje koje pogoduje razvoju tumora. Tim putem transkripcijski faktori NF-κB, STAT3 i MAPK, koji su uključeni u usmjeravanje staničnih odgovora na raznolik niz podražaja, pokreću izražaj gena za upalne citokine. Oslobođeni citokini (poput TNF-α, IL-1β i IL-6) mijenjaju sastav imunoloških stanica i imaju izravan učinak na tumorske stanice.

\* NF-κB (Nuclear Factor-kappa B), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase)

Interleukin-6 (IL-6) je pleiotropni citokin sa značajnim funkcijama u regulaciji imunološkog odgovora i njegova povećana ili deregulirana ekspresija značajno pridonosi patogenezi upalnih bolesti i karcinoma (133). Povišena razina IL-6 uključena je u razvoj KOPB-a i karcinoma pluća i poznato je da IL-6 pokreće rast i napredovanje karcinoma pluća u mišjim modelima (134). Karcinomi pluća sa K-ras mutacijom (uključene u stanične signalne puteve koji kontroliraju rast i sazrijevanje stanica i staničnu smrt) imaju intrinzične upalne karakteristike, s aktiviranim NF-kB signalnim putem i povišenom razinom IL-6, a ovaj upalni odgovor dodatno je pojačan učinkom KOPB-a na razvoj karcinoma (135). Također, nedavni podaci pokazali su da liječenje temeljeno na IL-6 suzbija razvoj karcinoma (136).

Međutim, upalni citokini, poput IL-6, mogu se transkripcijski promijeniti tijekom upale, što smanjuje vjerojatnost povezanosti njihove cirkulirajuće razine s prisutnošću određenog polimorfizma (137). Iako polimorfizmi imaju utjecaj na aktivnost gena, shvaćanje njihove funkcije otežano je složenošću ljudskog imunološkog sustava. Genetska promjena može utjecati na stanične procese, uključujući transkripciju gena, vezanje faktora transkripcije, promjene aktivnosti segmenata DNA i međudjelovanja proteina. Ovi pak stanični procesi mogu utjecati na imunofenotip ili biti pod njegovim utjecajem, što se može odraziti na ispoljavanje bolesti (138).

## 1.7 Svrha rada

KOPB i karcinom pluća povezani su sa poremećenom kontrolom imunološkog odgovora, a budući da je KOPB dokazano najveći neovisni čimbenik rizika za nastanak karcinoma pluća, mogli bi postojati preklapajući patogenetski mehanizmi koji potiču razvoj obje bolesti. Dosadašnje cjelogenomske analize povezanosti pokazale su da se genetski predispozicijski lokusi za karcinom pluća uvelike razlikuju u osoba sklonih razvoju KOBP-a. Ovim istraživanjem ispitana je povezanost strukturnih promjena gena odgovornih za aktivaciju i regulaciju imunološkog odgovora s nastankom KOPB-a i karcinoma pluća. Cilj ovog istraživanja bio je funkcionalno okarakterizirati uzročno-posljedičnu vezu između polimorfizama (SNP-ova) gena koji kodiraju receptore urođenog imunološkog sustava (Toll-like receptore) i razvoja karcinoma pluća u osoba sa i bez KOPB-a.

Snaga ove studije leži u formiranju slučajeva i kontrola sa dobro definiranim fenotipom KOBP-a, kao i ciljanom odabiru polimorfizama unutar gena koji su izravno uključeni u imunološke funkcije. Time je omogućeno strukturiranje istraživane populacije prema statusu KOBP-a i ispitivanje uloge polimorfizama gena za TLR-e u stvaranju upalnog okruženja i mogućem posljedičnom razvoju karcinom pluća. Uključivanje znanja o genima i putovima važnim za upalne procese u plućima i karcinogenezu predstavlja komplementarni pristup postavljanju novih hipoteza povezanih sa genetskim doprinosima i funkcionalnim razlikama u razvoju ovih dviju bolesti.

Rezultati ove studije svoju primjenu mogli bi imati u predviđanju i definiranju rizika za razvoj KOPB-a i karcinoma pluća te bi potencijalno poboljšali strategije ranog otkrivanja ili prevencije tih bolesti. Kliničke značajke bitne su u procjeni rizika, ali pojedinačni polimorfni biljezi služe dodatnom probiru. Karakterizacija specifičnih imunoloških signalnih putova i njihovih receptora, te utjecaja polimorfizama na njihovu funkciju može dovesti do boljeg razumijevanja njihove uloge u razvoju KOPB-a i karcinoma pluća što je nužno za određivanje najboljih ciljeva specifične terapije.

## **2 HIPOTEZA**

Polimorfizmi gena Toll-like receptora povezani su sa povećanim izgledom nastanka KOPB-a i karcinoma pluća moduliranjem aktivacije i regulacije upalnog odgovora.

### **3 CILJEVI RADA**

#### **3.1 Opći ciljevi**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost upale dišnog sustava i nastanka karcinoma pluća. Naime, epidemiološke studije su pokazale da je KOPB najsnažniji predisponirajući faktor za razvoj karcinoma pluća, neovisno o statusu pušenja. Također je vrlo dobro poznato da su KOPB i karcinom pluća povezani sa statusom pušenja, međutim samo će relativno mali broj pušača razviti jedan ili ob patološka stanja. Sve to upućuje na zaključak da bi genetička podloga pojedinca mogla imati značajnu ulogu u tim procesima. Stoga je u ovom istraživanju ispitana povezanost strukturnih promjena, polimorfizama unutar gena odgovornih za aktivaciju i regulaciju urođene imunosti, u prvom redu receptora urođene imunosti (Toll-like receptora), sa nastankom i razvojem KOPB-a i karcinoma pluća. Opći cilj ovog istraživanja je doprinijeti razumijevanju molekularnih mehanizama koji su uključeni u razvoj karcinoma pluća u bolesnika sa KOPB-om, što bi u konačnici moglo doprinijeti razvoju novih strategija liječenja.

### 3.2 Specifični ciljevi

- Genotipizacijom ispitati učestalost različitih polimorfizama gena koji kodiraju TLR-e unutar definiranih skupina ispitanika.
- U kontekstu sistemske upale ispitati zajedničke demografske karakteristike KOPB-a i karcinoma pluća.
- Ispitati povezanost analiziranih polimorfizama s kliničkim karakteristikama ispitanika.
- Dobiti uvid u funkcionalnost analiziranih gena metodom ELISA.
- Utvrditi moguću ulogu polimorfizama kao genskih biljega rizika, razvoja i progresije bolesti.

## 4 MATERIJALI I METODE

### 4.1 Ispitanici

Uzorci periferne krvi pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća (5 ml) prikupljeni su u Klinici za plućne bolesti Jordanovac KBC-a Zagreb. Probrani su bolesnici sa dijagnozom KOPB-a, KOPB-a i karcinoma pluća i ispitanicima sa izoliranom dijagnozom karcinoma pluća. Na svim bolesnicima primijenjeni su standardni dijagnostički kriteriji na osnovi kojih su svrstani u definirane skupine.

Procjena pacijenta uključila je prošlu medicinsku dokumentaciju koja je obuhvaćala značajne popratne bolesti, izloženost čimbenicima rizika za razvoj bolesti (pušenje) i fizički pregled. Procjena fenotipa provedena je testovima plućne funkcije (spirometrija), kliničkim podacima dobivenim iz tri kardinalna simptoma (zaduha, kronični kašalj i prisutnost iskašljaja) i godišnjom stopom pogoršanja (pojava postupnog pada razine vršne aktivnosti).

Spirometrija je provedena prema kriterijima Američkog torakalnog društva / Europskog respiratornog društva (ATS/ERS). Ograničenje protoka zraka klasificirano je prema forsiranom ekspiriju u jednoj sekundi, vrijednosti FEV<sub>1</sub>, a razina zaduhe je procijenjena pomoću Modified Medical Research Council upitnika (Prilog 1). Odnos FEV<sub>1</sub>/FVC nakon primjene bronhodilatatora manji od 0.7 smatrao se dijagnostičkim kriterijem ograničenja protoka zraka, a ograničenje protoka zraka stupnjevano je prema GOLD kriterijima (139), kao GOLD 1 (ppFEV<sub>1</sub> ≥80), GOLD 2 (50 ≤ ppFEV<sub>1</sub> <80), GOLD 3 (30 ≤ ppFEV<sub>1</sub> <50) i GOLD 4 (ppFEV<sub>1</sub> <30). Prisutnost simptoma podijeljen je na blaže (A i C) i teže (B i D), dok je prisutnost egzacerbacija (pogoršanja) podijeljena na neučestale (A i B) i učestale (C i D).

Komorbiditet je definiran kao prisutnost jednog ili više različitih poremećaja ili bolesti uz KOPB, bez obzira jesu li komorbiditeti izravno povezani s KOPB-om. Pacijenti su raspoređeni u kategorije s obzirom na indeks tjelesne mase (eng. BMI, *body mass index*) - težina osobe u kilogramima podijeljena s njezinom visinom u metarima na kvadrat (Prilog 2). Kvantifikacija pušenja cigareta korištena za mjerenje izloženosti osobe duhanu izražena je pack-year parametrom (PY) izračunatim množenjem broja dnevno popušanih kutija cigareta sa brojem godina kroz koje je osoba pušila.

Dijagnoza karcinoma pluća provedena je nakon biopsije ili kirurškog odstranjenja lezije, te je utvrđena patohistološka dijagnoza prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije: epitelni tumori (adenokarcinom, karcinom skvamoznih stanica i neuroendokrini tumori), mezenhimalni tumori, limfohistiocitni tumori, tumori ektopičnog porijekla i metastatski tumori.

Stadij karcinoma pluća utvrđen je TNM klasifikacijom na temelju primarnih karakteristika tumora (T), prisutnosti ili odsutnosti regionalnog zahvaćanja limfnih čvorova (N) i prisutnosti ili odsutnosti udaljenih metastaza (M) (140).

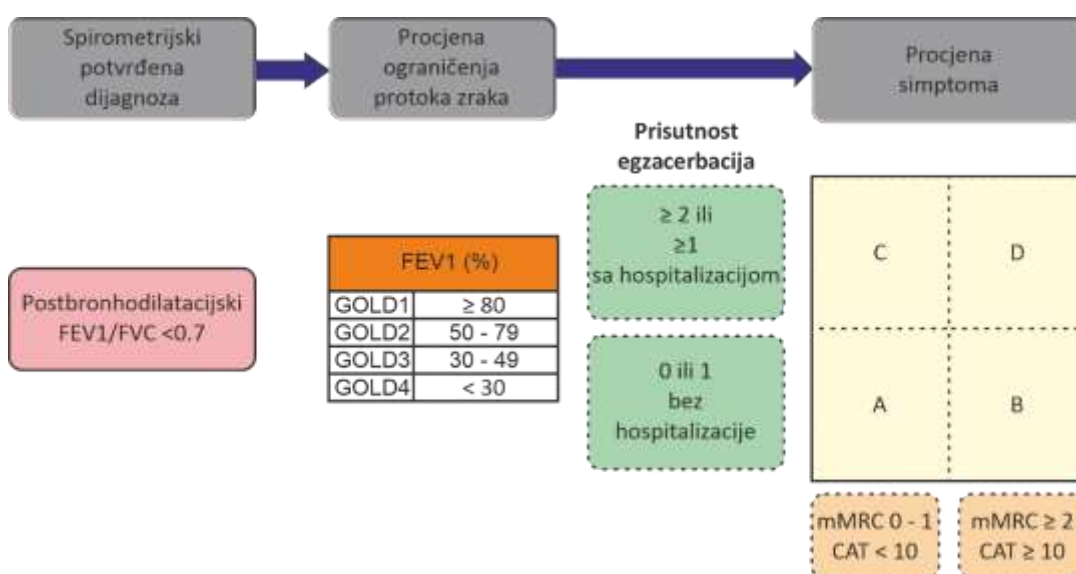
Analiza genotipizacije je provedena na genomskoj DNA ispitanika sa dijagnozom KOPB-a i karcinoma pluća, a analiza ispitivane koncentracije interleukina provedena je na serumima ispitanika. Svi bolesnici uključeni u ovo istraživanje potpisali su informirani pristanak i evidentirani su pod šifrom poznatom samo glavnom istraživaču čime je zajamčena njihova anonimnost. Uzorci periferne krvi bolesnika prikupljeni su u epruvete s antikoagulansom EDTA, te pohranjeni na 4°C. Isti dan krv je obrađena u svrhu odvajanja seruma na način da je centrifugirana na brzini od 1620g, 10min. Supernatant (serum) je alikvotiran i spremljen na -20°C, do funkcionalne analize. Preostali sediment, koji sadrži leukocite potrebne za izdvajanje DNA, pohranjen je na -20°C, do izdvajanja DNA.



## 4.2 Analiza demografskih podataka

U presječnu opservacijsku studiju uključene su karakteristike studijske populacije (stadij KOPB-a prema GOLD kriterijima, spol, dob kod postavljanja dijagnoze, kategorizacija osoba u pothranjene, normalne težine, prekomjerne težine ili pretile prema BMI-u, pušački status, te prisutnost komorbiditeta) i procjena kliničkih parametara (plućni funkcijski testovi, kategorizacija simptoma, učestalost egzacerbacija).

Slika 5 objašnjava ABCD sustav klasifikacije tžine KOPB-a prema GOLD kriterijima.



**Slika 5.** ABCD sustav prema GOLD kriterijima (139).

Post-bronhodilatatorni FEV1 / FVC < 70 definira KOBP, a ograničenje protoka zraka stupnjevano je prema GOLD kriterijima kao GOLD 1 (ppFEV1 ≥ 80), GOLD 2 (50 ≤ ppFEV1 < 80), GOLD 3 (30 ≤ ppFEV1 < 50) i GOLD 4 (ppFEV1 < 30). Klasifikacija ABCD skupina temelji se na tablici 2 × 2 sa poljima označenim sa A, B, C i D. Prisutnost simptoma podijeljen je na blaže (A i C) i teže (B i D), dok je prisutnost egzacerbacija (pogoršanja) podijeljena na neučestale (A i B) i učestale (C i D). Prema potonjem, bolesnike se smješta u skupine s obzirom na rizik od pogoršanja prema ograničenju protoka zraka ili povijesti egzacerbacija.

Kod bolesnika sa karcinomom pluća bolest je potvrđena patohistološkom dijagnozom i stadij karcinoma pluća kategoriziran je prema TNM kriterijima. Slika 6 objašnjava TNM klasifikaciju.

	<b>N<sub>0</sub></b> – bez pozitivnih limfnih čvorova	<b>N<sub>1</sub></b> – pozitivni ipsilateralni peribronhalni, hilarni i intrapulmonarni limfni čvorovi	<b>N<sub>2</sub></b> – pozitivni ipsilateralni medijastinalni i subkarinarni limfni čvorovi	<b>N<sub>3</sub></b> – pozitivni kontralateralni medijastinalni i hilarni ili ipsilateralni / kontralateralni skalenski i supra-klavikularni limfni čvorovi
<b>T<sub>1</sub></b> ≤ 3cm	<b>1A</b>	<b>2B</b>	<b>3A</b>	<b>3B</b>
<b>T<sub>2a</sub></b> > 3cm ≤ 4cm	<b>1B</b>	<b>2B</b>	<b>3A</b>	<b>3B</b>
<b>T<sub>2b</sub></b> > 4cm ≤ 5cm	<b>2A</b>	<b>2B</b>	<b>3A</b>	<b>3B</b>
<b>T<sub>3</sub></b> > 5cm ≤ 7cm; ili invazija prsnog koša, perikarda, freničnog živca ili satelitski čvorovi u istom plućnom režnju	<b>2B</b>	<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>
<b>T<sub>4</sub></b> > 7cm; ili invazija medijastinuma, dijafragme, srca, velikih krvnih žila, rekurentnog laringealnog živca, traheje, karine, jednjaka, kralježnice ili dodatni tumor u drugom režnju istog plućnog krila	<b>3A</b>	<b>3A</b>	<b>3B</b>	<b>3C</b>
<b>M<sub>1a</sub></b> – udaljena metastaza u kontralateralnom pluću, pleuri, perikardu ili maligni pleuralni izljev	<b>4A</b>	<b>4A</b>	<b>4A</b>	<b>4A</b>
<b>M<sub>1b</sub></b> – jedna udaljena ekstratorakalna metastaza	<b>4A</b>	<b>4A</b>	<b>4A</b>	<b>4A</b>
<b>M<sub>1c</sub></b> – multiple udaljene ekstratorakalne metastaze u jednom ili više organa	<b>4B</b>	<b>4B</b>	<b>4B</b>	<b>4B</b>

**Slika 6.** TNM klasifikacija karcinoma pluća (140).

Definicija (T) uključuje veličinu tumora i druge kriterije opsega, poput endobronhalne lokacije, lokalne invazije i zasebnih tumorskih čvorova. Definicija (N) predstavlja zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova prema njihovom položaju: supraklavikularni, gornji medijastinalni, donji medijastinalni, aortalni, subkarinarni i plućni čvorovi. Definicija (M) temelji se na prisutnosti metastaza, njihovom mjestu i broju. Razlikuju se regionalna metastatska bolest i pojedinačna ili višestruko udaljena metastatska bolest.

### 4.3 Izdvajanje genomske DNA metodom izoliranja

Za potrebe izdvajanja genomske DNA koristila se metoda izoliranja. Primjenom osmotske lize stanica uklonjeni su eritrociti iz uzorka krvi te su razgrađeni leukociti iz kojih se oslobodila genomska DNA. Uzorci krvi prikupljeni su u epruveti s antikoagulansom EDTA te pohranjeni na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nakon što se krv otopila na sobnoj temperaturi, jednom volumenu krvi dodan je trostruki volumen pufera za lizu eritrocita (eng. Red Cell Lysis Buffer, RCLB: 10mM Tris-HCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM NaCl, pH 7.6, steriliziran autoklaviranjem, čuvan na  $+4^{\circ}\text{C}$ ) nakon čega se smjesa prebacila na led i inkubirala 15 minuta. Uzorak je centrifugiran, a dobiveni sediment, sa ostacima liziranih eritrocita, dekantiran. Preostali sediment leukocita višekratno je ispran sa novom količinom RCLB-a. Na isprani sediment dodan je pufer SE (75 mM NaCl, 25 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  2, pH 8, steriliziran autoklaviranjem, čuvan na  $+4^{\circ}\text{C}$ ), 10% otopina SDS-a (natrijev laurilsulfat) i proteinaza K koncentracije 0,1 mg/mL. Dobiveni sediment odvojen je od dna epruvete i inkubiran preko noći na  $37^{\circ}\text{C}$  u vodenoj kupelji. Nakon inkubacije, smjesa je pomiješana sa 1/3 volumena 5 M NaCl (750  $\mu\text{L}$ ), u svrhu taloženja proteina. Smjesa je centrifugirana (Eppendorf centrifuga 5403, Njemačka) 15 minuta na 800g, pri sobnoj temperaturi, a dobiveni supernatant dekantiran i ponovno centrifugiran pod istim uvjetima. Nakon toga je pročišćeni sediment pomiješan sa istim volumenom 2-propanola (Kemika, Hrvatska), a istaložena DNA staklenom kukicom prenešena u ledeni 70% etanol. Tako isprana DNA prenesena je u TE pufer (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) i pohranjena na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Kvaliteta izolirane DNA ispitana je elektroforezom u gelu agaroze, a koncentracija DNA određena metodom spektrofotometrije, na UV/VIS spektrofotometru.

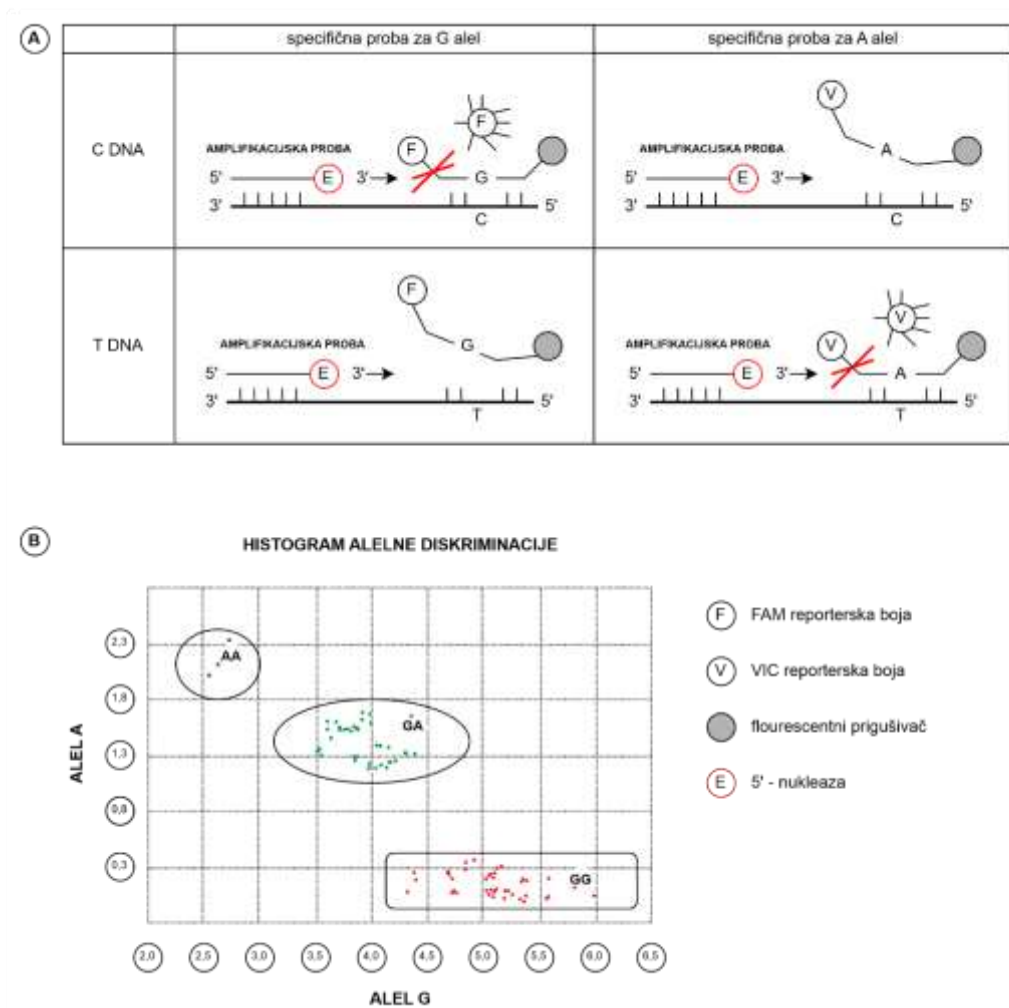
#### 4.4 Genotipizacija uzoraka metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu

U svrhu određivanja prisutnosti i učestalosti pojedinih genetičkih biljega u genima od interesa korištena je reakcija lančanog umnožavanja genomske DNK (eng. PCR, *polymerase chain reaction*) i to primjenom specifičnih proba (TaqMan "probe", Applied Biosystems). Reakcija lančanog umnožavanja genomske DNA je metoda umnožavanja željenog odsječka DNA u uvjetima *in vitro*, pomoću termostabilnog enzima, Taq-DNA polimeraze i dvije konstruirane oligonukleotidne početnice. Reakcija se odvija u tri koraka: 1. proces denaturacije kalupa DNA, 2. sparivanje početnica (engl. *annealing*) i 3. sinteza komplementarnih lanaca DNA. TaqMan "probe" su jedan od primjera tzv. hidrolizirajućih proba koje koriste 5'-3' egzonukleaznu aktivnost enzima Taq polimeraze, što omogućava cijepanje dvostruko obilježene komplementarne probe prethodno vezane za kalup DNA.

Hibridizirajuća proba je oligonukleotidini odsječak visoko komplementaran kalupu DNA i obilježen fluorescencijskom probom (eng. *reporter*) i prigušujućom probom (eng. *quencher*). One se nalaze na suprotnim krajevima probe i kad su u međusobnoj blizini, blizina prigušivača onemogućava fluorescenciju reporterske boje. U ovom radu uzorci su genotipizirani metodom alelne diskriminacije, korištenjem TaqMan "proba", koje omogućavaju istovremeno umnažanje specifičnih alela metodom lančane reakcije polimeraze i njihovu detekciju. Kod genotipizacije uzoraka DNA u ovom istraživanju, u reakcijskoj smjesi korištene su obilježene probe koje su specifične za oba alela koja su testirana na određenom lokusu. U ovom radu analizirane su tzv. točkasti polimorfizmi – SNP-ovi.

Polazi se od pretpostavke da uzorak genomske DNA svakog ispitanika može biti ili heterozigot, ili jedan odnosno drugi homozigot. Komercijalno dostupni eseji su dizajnirani tako da sadrže specifične početnice za odsječak DNA od interesa i visoko komplementarne probe za jedan i drugi alel. Ukoliko je uzorak ispitanika homozigot, tada će analiza alelne diskriminacije pokazati da je, u krajnjem očitavanju ukupne fluorescencije na kraju reakcije PCR (eng. *end-point analysis*), instrument očitao samo fluorescenciju karakterističnu za taj alel. U slučaju kada je ispitanik heterozigot, krajnja

analiza očitat će razinu fluorescencije specifične za oba alela. Princip i primjer rezultata genotipizacije polimorfizma TaqMan PCR metodom prikazan je na Slici 7.



**Slika 7.** Princip i primjer rezultata genotipizacije polimorfizma TaqMan PCR metodom. Preuzeto i prilagođeno iz (141) uz dozvolu Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- A. Kada su probe specifične za alel potpuno hibridizirane sa DNA uzorkom, Taq polimeraza (koja ima aktivnost 5'-nukleaze) cijepa reportersku boju (VIC/FAM) i emitira fluorescenciju. Međutim, kada postoji jedna osnovna neusklađenost između probe i DNA uzorka, hibridizacija je neučinkovita i odgovarajuća reporterska boja ne može adekvatno emitirati fluorescenciju.
- B. Na temelju intenziteta fluorescentnog signala FAM i VIC uzorci se automatski klasificiraju u tri skupine koje odgovaraju genotipovima GG, GA i AA.

#### 4.5 Analiza baza podataka i kriteriji odabira SNP-ova za analizu

Odabir polimorfnih biljega koji su uključeni u analizu genotipizacije učinjen je pomoću National Center for Biotechnology Information (NCBI) baze podataka dostupne na PubMed-u, koja sadrži popis mutacija/polimorfizama unutar funkcionalno značajnih regija proteina i gena. Za ovo istraživanje izabrani su polimorfni genski biljezi za proteine obitelji TLR. Prilikom odabira biljega uključenih u analizu korišteni su sljedeći kriteriji:

1. epidemiološki ili molekularno biološki literaturni nalazi koji upućuju na povezanost gena od interesa s poremećenom regulacijom upalne reakcije i nastankom tumora;
2. mogući utjecaj polimorfnog biljega na razinu ekspresije gena/proteina ili na funkcionalnost proteina mijenjanjem slijeda aminokiselina;
3. učestalost manje zastupljenog alela (engl. Minor Allele Frequency, MAF) u testiranim populacijama morala je biti veća od 1%.

U ovom istraživanju analizirani su sljedeći polimorfni biljezi, koji su zadovoljili postavljene kriterije: TLR1 rs3923647, TLR1 rs4833095, TLR1 rs5743611, TLR2 rs13150331, TLR2 rs5743708, TLR2 rs5743704, TLR4 rs4986790, TLR5 rs2072493, TLR5 rs5744168, TLR5 rs725084, TLR5 rs5744174, TLR6 rs5743810 i TLR9 rs352139.

#### 4.6 Određivanje prisutnosti citokina imunoenzimskim testom

U svrhu određivanja indirektno funkcionalne značajnosti pronađenih genomskih promjena korištena je metoda ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Kako bi se potvrdilo da različiti SNP-ovi mogu promijeniti aktivaciju NF- $\kappa$ B na razini proteina, ELISA-om je izmjerena koncentracija interleukina 6 (IL-6) u serumima periferne krvi bolesnika.

ELISA je imunoenzimski test visoke osjetljivosti za određivanje prisutnosti i koncentracije specifičnih analita (proteina) pomoću protutijela. U ovom istraživanju korišten je ljudski IL-6 ELISA Ready-SET-Go! set reagensa (eBioscience) koji sadrži potrebne reagense za provođenje kvantitativnih imunoenzimskih testova. Ovaj ELISA set reagensa posebno je stvoren za precizno mjerenje razine humanog IL-6 proteina u uzorcima, uključujući serum, plazmu i supernatante iz staničnih kultura. Ploče sa 96 jažica prethodno su presvučene sa IL-6 monoklonskim antitijelima u puferu i inkubirane preko noći na 4 °C. Prema protokolu koji je osigurala tvrtka, jažice su potom isprane 3 puta sa 250  $\mu$ L pufera za ispiranje (Phosphate Buffered Saline, 0.05% TWEEN® 20, pH 7.4). Nakon ispiranja jažice su blokirane sredstvom za razrjeđivanje i inkubirane na sobnoj temperaturi 1 sat. U odgovarajuće jažice dodano je 100  $\mu$ L standardne serije razrjeđenja humanog rekombinantnog IL-6. Izvedeno je dvostruko serijsko razrjeđivanje standarda kako bi se napravila takozvana "standardna krivulja" za imunoanalizu. Dodano je 100  $\mu$ L seruma periferne krvi bolesnika u odgovarajuće jažice i ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi 2 sata. Ponovljena su ispiranja, dodano je protutijelo za detekciju i ploče su inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja dodano je 100  $\mu$ L Av-HRP (eng. *Avidin-Horseradish Peroxidase*). Av-HRP koristan je za otkrivanje biotinom označenih protutijela. Avidin se s visokim afinitetom veže na biotin, a HRP djeluje na topive podloge dajući kolorimetrijsku reakciju. U jažice je potom dodan supstrat za Av-HRP, otopina tetrametilbenzidina (TMB). Nakon ponovnog ispiranja i inkubiranja u jažice je dodano 50  $\mu$ L otopine za zaustavljanje (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Ploča je očitana na valnoj duljini 450nm i podaci su analizirani.

Koncentracije interleukina određena je takozvanom indirektnom metodom određivanja koncentracije proteina, što podrazumijeva mjerenje apsorbancije otopine proteina pomoću spektrofotometra, i potom preračunavanje vrijednosti izmjerene

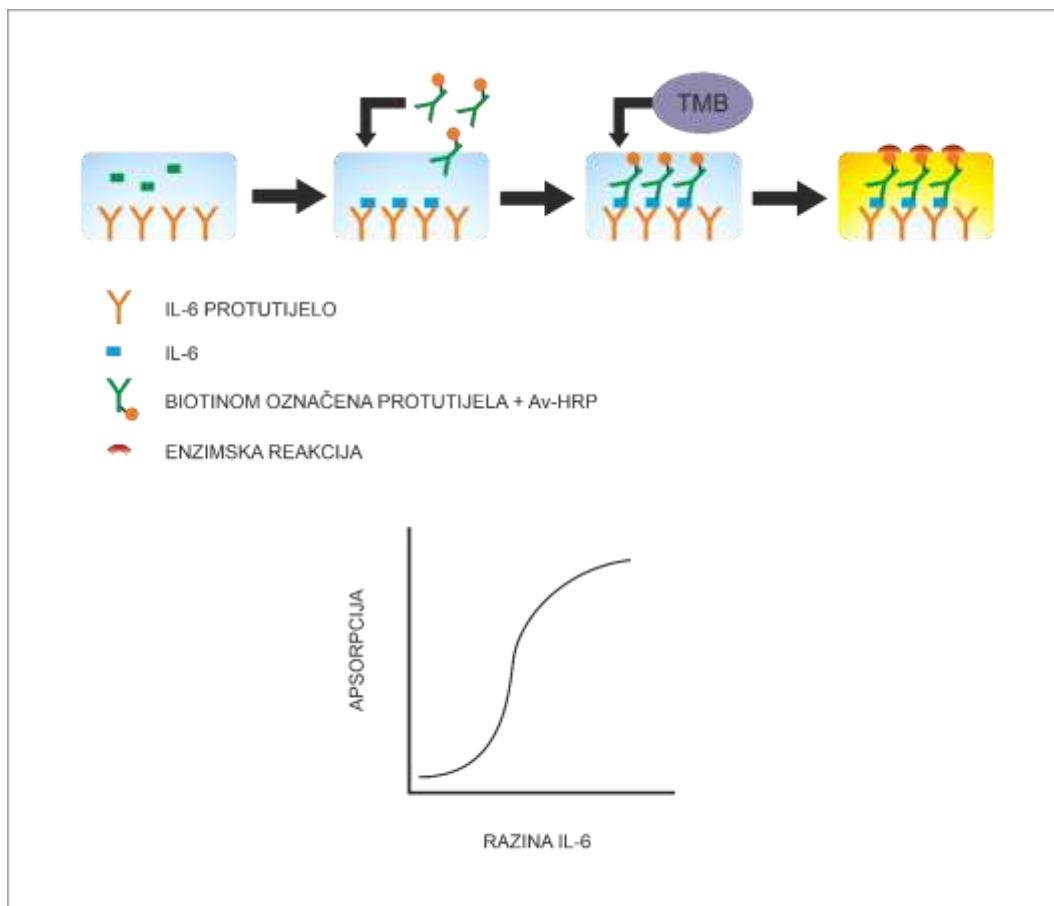
apsorbancije u količinu proteina. Izložimo li otopinu proteina elektromagnetskom zračenju točno određene valne duljine, tada molekule u otopini apsorbiraju dio tog zračenja, a dio zračenja prolazi kroz kivetu sa otopinom molekula te biva detektiran (izmjerena) na detektoru. Ovisnost količine apsorbiranog zračenja definirana je Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Lambert Beerov zakon kaže da apsorbacija (A) jednaka umnošku molarnog apsorpcijskog koeficijenta,  $\varepsilon$ (L/mol cm), koncentracije molekula u uzorku, c(mol/L) i duljine puta kroz kivetu, l(cm). Koristeći se gore navedenom formulom možemo na osnovi izmjerene apsorbancije, uz pomoć standardne krivulje, odrediti koncentraciju molekula u uzorku.

Ovom metodom određena je koncentracija citokina u serumu pacijenata, izražena u pg/ml ( $1\text{pg/ml} = 3.67 \times 10^{-12} \text{mol/L}$ ). Utvrđena vrijednost uspoređena je sa genetičkom podlogom, kako bi na taj način dobili uvid u funkcionalnost analiziranih gena. Princip ELISA metode ispitivanja razine humanog IL-6 u serumu prikazan je na Slici 8.





**Slika 8.** Princip ELISA metode ispitivanja razine humanog IL-6 u serumu. Preuzeto iz (142) uz dozvolu [MBL International](#) | A JSR Life Sciences Company.

Mikrotitarska pločica je prethodno presvučena sa određenom količinom IL-6 protutijela, pružajući vezna mjesta za IL-6 prisutan u uzorcima. Nakon inkubacije preko noći, jažice se isperu kako bi se uklonio nevezani proteini. Potom se dodaju biotinom označena protutijela koja se selektivno vežu na zarobljeni IL-6. Ispiru se nevezana protutijela. Zatim se primjenjuje enzim za otkrivanje (avidin konjugirana peroksidaza, Av-HRP) koji se veže sa imobiliziranim biotinom označenim imunokompleksom. Jažice se temeljito isperu da se ukloni svaki nevezani enzim za detekciju. U jažice se dodaje otopina tetrametilbenzidina (TMB), supstrat za Av-HRP. TMB se peroksidazom oksidira u produkt tamnoplave boje. Nakon dodavanja otopine za zaustavljanje stvara se bistro žuto obojen proizvod. Mikrotitarska pločica se zatim očitava pomoću spektrofotometra na 450nm.

## 4.7 Statistička analiza podataka

Podaci su prikazani tablično i grafički. Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone a razlike između nezavisnih skupina su analizirane Mann-Whitney U testom, odnosno Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom kada su analizirane razlike između tri skupine. U post-hoc testiranje uzimale su se samo prethodno značajne vrijednosti dobivene Kruskal-Wallisovim testom.

Razlike u kategorijskim kliničkim karakteristikama između ispitivanih skupina analizirane su Fisher-Freeman-Haltonovim testom. Istaknuti su polimorfizmi čija se raspodjela alela značajno razlikovala ( $p < 0,05$  za Fisher-Freeman-Haltonov test). Povezanost genotipova i rizika od razvoja karcinoma pluća procijenjena je logističkom regresijom računajući omjere vjerojatnosti (OR), 95% intervale pouzdanosti (95% CI) i P vrijednosti. Polimorfizmi povezani s rizikom za definirani skup pacijenata u neprilagođenim analizama (rs5743611, rs2072493, rs5744174, rs725084 i rs352139), ponovno su analizirani na povećanom broju uzoraka s dodatnom korekcijom prema dobi i spolu. P vrijednosti su se smatrale značajnima pri  $\leq 0,05$ , s razinom značajnosti za cijelu studiju pri  $p \leq 0,0038$  uzimajući u obzir Bonferronijevu korekciju za višestruko ispitivanje. U analizi se koristila licencirana programska podrška MedCalc Statistical Software version 19.4.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

## 5 REZULTATI

### 5.1 Rezultati analize općih karakteristika ispitanika

Cilj ovih analiza bio je ispitati karakteristike studijske populacije (stadij KOPB-a prema GOLD kriterijima, spol, dob kod postavljanja dijagnoze, kategorizacija pacijenata prema nutritivnom statusu, pušački status, prisutnost komorbiditeta) i procijeniti kliničke parametare (plućni funkcijski testovi, kategorizacija simptoma, učestalost egzacerbacija). Kod bolesnika sa karcinomom pluća utvrđena je patohistološka dijagnoza i stadij karcinoma kategoriziran je prema TNM kriterijima. Navedene karakteristike su ispitane sa ciljem utvrđivanja njihove učestalosti i raspodjele među definiranim skupinama.

U istraživanje je uključeno ukupno 940 pacijenta, podijeljenih u tri skupine: pacijenti sa izoliranim KOPB-om (472, 50.2%), oni sa KOPB-om i karcinom pluća (279, 29.7%) i pacijenti samo sa karcinomom pluća (189, 20.1%). Svi demografski i klinički parametri detaljno su prikazani u Tablicama 1-4. Iako je muški spol zastupljeniji u istraživanoj populaciji, u skupini koja je imala samo karcinom pluća bilo je značajno više žena ( $P < 0,001$ ) u odnosu na ostale dvije skupine. KOPB je klasificiran prema GOLD kriterijima (5), počevši od najblažeg do najtežeg stadija ( $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$ ), a većina pacijenata pripadala je GOLD B stadiju. U skupini pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća (KP) značajno češći su bili pripadnici GOLD stadija A i B u odnosu na skupinu samo sa KOPB-om ( $P < 0,001$ ) (Tablica 1).

Većina istraživane populacije bila je izložena duhanskom dimu, bilo kao aktivni ili pasivni pušači. Značajno najviše nepušača u odnosu na ostale skupine bilo je u skupini samo sa karcinomom pluća. Skupina pacijenata sa izoliranim KOPB-om je imala značajno nižu smrtnost u odnosu na skupinu pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća ( $P < 0,001$ ) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Prikaz raspodjele ispitanika prema spolu, GOLD klasifikaciji, pušačkom statusu i smrtnom ishodu

		SKUPINA						P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
		KOPB (1) N=472		KOPB + KP (2) N=279		KP (3) N=189				
		N	%	N	%	N	%			
Spol	Ženski	135	28,60%	73	26,20%	82	43,40%	0,500	<0,001	<0,001
	Muški	337	71,40%	206	73,80%	107	56,60%			
GOLD klasifikacija	A	112	25,70%	98	36,20%			<0,001		
	B	124	28,40%	134	49,40%					
	C	107	24,50%	31	11,40%					
	D	93	21,30%	8	3,00%					
Pušenje	Ne-pušači	38	8,30%	27	9,80%	34	18,70%	0,005	<0,001	0,019
	Pasivni pušači	277	60,50%	133	48,40%	85	46,70%			
	Aktivni pušači	143	31,20%	115	41,80%	63	34,60%			
Smrt	Ne	174	66,40%	108	48,90%	78	51,30%	<0,001	0,003	0,674
	Da	88	33,60%	113	51,10%	74	48,70%			

P<sup>1</sup>: Fisher-Freeman-Haltonov test, P vrijednost između KOPB (1) i KOPB+karcinom pluća (2) skupina

P<sup>2</sup>: Fisher-Freeman-Haltonov test, P vrijednost između KOPB (1) i Karcinom pluća (3) skupina

P<sup>3</sup>: Fisher-Freeman-Haltonov test, P vrijednost između KOPB+karcinom pluća (2) i Karcinom pluća (3) skupina

Uz izloženost duhanskom dimu, istraženo je i profesionalno izlaganje štetnim česticama, kao važan okolišni čimbenici rizika za razvoj KOPB-a i karcinoma pluća (prema kriterijima Europske agencije za sigurnost i zdravlje na radu) (143). Većina pacijenata uključenih u istraživanje ipak nije bila izložena štetnim česticama u radnom okruženju (Tablica 2), no profesionalna izloženost raznim česticama i parama često je podcjenjen čimbenik rizika za razvoj KOPB-a i karcinoma pluća. Plućni funkcijski test čija je smanjena vrijednost povezana sa kumulativnom izloženošću duhanskom dimu i profesionalnom izloženošću štetnim česticama je difuzijski kapacitet pluća za ugljični monoksid (eng. DLCO, *Diffusing capacity for carbon monoxide*). U populaciji uključenoj u ovo istraživanje, skupina koja je imala samo KOPB imala je najveći udio značajnog pada kapaciteta difuzije ugljičnog monoksida u odnosu na ostale skupine (P<0,001) (Tablica 2).

Komorbidity su općenito često prisutni kod bolesnika sa KOBP-om i karcinomom pluća, što je i slučaj sa poremećajima i bolestima prisutnim u populaciji uključenoj u ovo istraživanje. Najčešći komorbidity u istraživanoj populaciji bili su arterijska hipertenzija (464, 49.4%), kardiovaskularne bolesti (225, 23.9%) i dijabetes (137, 14.6%). Nasljedni nedostatak  $\alpha$ 1 antitripsina, koji predstavlja jedan od rijetkih

nasljednih čimbenika za nastanak i razvoj KOPB-a, bio je prisutan u nešto više od 1% pacijenata u skupini sa izoliranim KOPB-om. Od komorbiditeta, arterijska hipertenzija je bila najzastupljenija u skupini pacijenata sa izoliranim KOPB-om, i značajno češća u odnosu na skupinu pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća ( $P=0,035$ ). Učestalost kardiovaskularnih bolesti je bila značajno veća u skupini pacijenata sa KOPB-om u odnosu na ostale dvije skupine ( $P<0,001$ ). Gastrointestinalni komorbiditeti bili su češći kod pacijenata sa KOPB-om u odnosu na skupinu sa karcinomom pluća ( $P=0,035$ ). Također, tuberkuloza je bila najčešća u skupini pacijenata sa izoliranim KOPB-om i značajno češća u odnosu na ostale dvije skupine ( $P<0,001$ ;  $P=0,049$ ). Mentalne bolesti i poremećaji su bili značajno češći u skupini pacijenata sa KOPB-om u odnosu na skupinu samo sa karcinomom pluća ( $P=0,006$ ).

**Tablica 2.** Razlike u općim i kliničkim karakteristikama između skupina

		SKUPINA						P <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>
		KOPB (1) N=472		KOPB + KP (2) N=279		KP (3) N=189				
		N	%	N	%	N	%			
↓DLCO	Ne	55	19,1%	63	26,0%	92	60,1%	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Blagi	61	21,2%	88	36,4%	38	24,8%			
	Umjereni	93	32,3%	78	32,2%	21	13,7%			
	Teški	79	27,4%	13	5,4%	2	1,3%			
α-1ATD (+/-)	Ne	467	98,9%	279	100,0%	189	100,0%	0,164	0,329	1,000
	Da	5	1,1%	0	0,0%	0	0,0%			
Profesionalna ekspozicija	Ne	391	82,8%	232	83,2%	147	77,8%	1,000	0,150	0,152
	Da	81	17,2%	47	16,8%	42	22,2%			
Osteoporoz	Ne	451	95,6%	273	97,8%	188	99,5%	0,110	0,008	0,250
	Da	21	4,4%	6	2,2%	1	0,5%			
Ekstrapulmonalne neoplazme	Ne	425	90,0%	243	87,1%	160	84,7%	0,229	0,059	0,497
	Da	47	10,0%	36	12,9%	29	15,3%			
Arterijska hipertenzija	Ne	221	46,8%	153	54,8%	102	54,0%	<b>0,035</b>	0,102	0,925
	Da	251	53,2%	126	45,2%	87	46,0%			
Kardiovaskularne bolesti	Ne	323	68,4%	237	84,9%	155	82,0%	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,444
	Da	149	31,6%	42	15,1%	34	18,0%			
Dijabetes	Ne	396	83,9%	242	86,7%	165	87,3%	0,342	0,283	0,890
	Da	76	16,1%	37	13,3%	24	12,7%			
Kronična bubrežna bolest	Ne	448	94,9%	273	97,8%	185	97,9%	0,054	0,132	1,000
	Da	24	5,1%	6	2,2%	4	2,1%			
Gastrointesti-nalne bolesti	Ne	422	89,4%	258	92,5%	179	94,7%	0,197	<b>0,035</b>	0,449
	Da	50	10,6%	21	7,5%	10	5,3%			
Tuberkuloza	Ne	437	92,6%	275	98,6%	183	96,8%	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,049</b>	0,213
	Da	35	7,4%	4	1,4%	6	3,2%			
Mentalne bolesti i poremećaji	Ne	441	93,4%	270	96,8%	186	98,4%	0,063	<b>0,006</b>	0,376
	Da	31	6,6%	9	3,2%	3	1,6%			

P<sup>1</sup>: Fisher-Freeman-Haltonov test, P vrijednost između KOPB (1) i KOPB+karcinom pluća (2) skupina

P<sup>2</sup>: Fisher-Freeman-Haltonov test, P vrijednost između KOPB (1) i Karcinom pluća (3) skupina

P<sup>3</sup>: Fisher-Freeman-Haltonov test, P vrijednost između KOPB+karcinom pluća (2) i Karcinom pluća (3) skupina

Tablica 3 prikazuje razlike u histološkim podtipovima karcinoma pluća i njihovom stadiju sa i bez prisutnosti KOPB-a. U istraživanoj populaciji uključenoj u izradu ove disertacije, udio adenokarcinoma bio je značajno veći u skupini sa izoliranim karcinomom pluća (P<0,001), dok je karcinom pločastih stanica bio češći u skupini koja je imala i KOPB (P<0,001). Teži stadiji bolesti poput stadija IV bili su značajno zastupljeniji u skupini samo sa karcinomom pluća (P=0,027).

**Tablica 3.** Razlike u karakteristikama neoplazmi između skupina: SCLC – sitnostanični karcinom pluća, LCLC – nesitnostanični karcinom pluća, AdCa – adenokarcinom pluća, SqCC – planocelularni karcinom pluća

		SKUPINE				P
		KOPB + karcinom pluća (N=279)		Karcinom pluća (N=189)		
		N	%	N	%	
SCLC	Ne	263	94,3%	181	95,8%	0,528
	Da	16	5,7%	8	4,2%	
LCLC	Ne	253	90,7%	177	93,7%	0,302
	Da	26	9,3%	12	6,3%	
AdCa	Ne	165	59,1%	80	42,3%	<0,001
	Da	114	40,9%	109	57,7%	
SqCC	Ne	172	61,6%	147	77,8%	<0,001
	Da	107	38,4%	42	22,2%	
Ostalo	Ne	265	95,0%	171	90,5%	0,064
	Da	14	5,0%	18	9,5%	
Stadiji	I A	24	9,5%	8	4,7%	0,027
	I B	41	16,2%	36	21,3%	
	II A	44	17,4%	29	17,2%	
	II B	44	17,4%	17	10,1%	
	III A	54	21,3%	39	23,1%	
	III B	11	4,3%	3	1,8%	
	IV	35	13,8%	37	21,9%	

Skupina pacijenata sa KOPB-om imala je značajno mlađu dob pri dijagnozi u odnosu na na ostale dvije skupine ( $P < 0,001$  i  $P = 0,005$ ), a medijan preživljenja kod KOPB-a bio je značajno veći u skupini koja je imala samo KOPB ( $P < 0,001$ ) dok je preživljenje između skupina sa karcinomom pluća bilo podjednako ( $P = 0,229$ ) (Tablica 4). Izloženost duhanskom dimu od ranije je prepoznata kao značajan rizični čimbenik za razvoj KOPB-a i karcinoma pluća. Najveću ekspoziciju duhanskom dimu imali su pacijenti u skupini sa KOPB-om i karcinomom pluća te je medijan vrijednosti pack-year (mjerna jedinica izloženosti osobe duhanskom dimu) bio značajno veći u odnosu na ostale skupine ( $P = 0,009$  i  $P = 0,032$ ) (Tablica 4).

Značajan čimbenik u razvoju KOPB-a i karcinoma pluća također je i nutritivni status bolesnika. On je procijenjen indeksom tjelesne mase (eng. BMI, *Body Mass Index*) i pacijenti su raspoređeni u kategorije s obzirom na BMI. Većina pacijenata nalazila se u kategoriji normalne težine, no indeks tjelesne mase je bio značajno najniži u skupini

pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća, u odnosu na ostale dvije skupine ( $P=0,006$  i  $P=0,015$ ) (Tablica 4).

Osnovni pokazatelji procjene ograničenja protoka zraka u plućima, FEV1 i Tiffeneau indeks ( $FEV1/FVC$ )  $<0,7$ , u istraživanoj populaciji bili su značajno nižih vrijednosti u skupini pacijenata sa izoliranim KOPB-om u odnosu na skupine sa karcinomom pluća ( $P<0,001$ ) (Tablica 4).



**Tablica 4.** Razlike u kontinuiranim općim i kliničkim karakteristikama ispitanika između ispitivanih skupina

Skupina		N	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
							25.	Medijan	75.
Dob pri dijagnozi	KOPB	432	58,97	10,46	29,00	84,00	52,00	59,00	67,00
	KOPB + KP	279	62,94	7,58	33,00	85,00	58,00	63,00	68,00
	KP	186	61,44	9,77	37,00	87,00	54,00	62,00	68,25
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	KOPB	446	27,10	5,91	14,20	52,20	22,65	26,91	30,40
	KOPB + KP	276	25,81	4,57	14,53	40,76	22,61	25,38	28,67
	KP	182	26,95	4,53	18,40	42,91	23,45	26,92	29,56
Preživljenje KOPB	KOPB	62	83,53	69,01	5,00	323,00	35,25	63,00	113,00
	KOPB + KP	110	33,94	40,95	1,00	331,00	11,75	23,50	44,00
Preživljenje karcinom pluća	KOPB + KP	112	24,35	19,51	1,00	115,00	11,00	19,00	36,75
	KP	73	30,97	29,92	1,00	159,00	13,00	22,00	43,00
Pack-year	KOPB	317	44,17	24,36	4,00	160,00	30,00	40,00	52,00
	KOPB + KP	199	49,23	26,08	1,00	180,00	30,00	45,00	60,00
	KP	112	42,96	23,39	3,00	125,00	30,00	40,00	54,75
Tiffeneau index	KOPB	424	56,34	12,66	24,21	95,67	47,55	57,91	65,73
	KOPB + KP	270	65,41	8,57	31,40	87,43	61,10	66,69	71,33
	KP	153	80,26	5,74	65,52	105,20	76,53	79,99	83,13
FEV1 (%)	KOPB	428	53,26	20,92	10,50	122,00	37,00	51,95	68,28
	KOPB + KP	271	70,79	18,65	24,30	115,00	57,80	72,90	84,00
	KP	157	96,00	16,10	55,00	139,40	85,75	96,20	106,20

	Mann-Whitney U test: P vrijednosti		
	KOPB vs. KOPB + KP	KOPB vs. KP	KOPB + KP vs. KP
Dob pri dijagnozi	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>	0,107
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>0,006</b>	0,930	<b>0,015</b>
Preživljenje KOPB	<b>&lt;0,001</b>	-	-
Preživljenje KP	-	-	0,229
Pack-year	<b>0,009</b>	0,797	<b>0,032</b>
Tiffeneau indeks	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
FEV1 (%)	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

## 5.2 Rezultati analize odabira polimorfnih biljega

Cilj ovih analiza bio je ispitati, u dostupnoj bazi podataka, koji od polimorfnih biljega, smještenih u genima koji kodiraju za TLR-e, zadovoljavaju postavljene kriterije - povezanost sa poremećenom regulacijom upalne reakcije i razvojem karcinoma, mogući utjecaj na razinu ekspresije gena / proteina ili na funkcionalnost proteina i učestalost manje zastupljenog alela (eng. MAF, *Minor Allele Frequency*) u testiranim populacijama veća od 1%. Pretraživanjem baze podataka i dostupne literature zaključeno je da polimorfni biljezi smješteni u genima TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR 6 i TLR9 (ukupno 13 SNP-ova) zadovoljavaju postavljene kriterije. Lista polimorfnih biljega uključenih u ovo istraživanje nalazi se u Tablici 5. Tablica 5 prikazuje TLR genske polimorfizme obzirom na njihovu lokalizaciju, frekvenciju alela, karakteriziranom promjenom nukleotida i funkcijom. Kao što se može vidjeti iz tablice, najveća zastupljenost MAF CEU bila je za polimorfizme smještene u genima TLR9 rs352139 (48%) i TLR5 rs725084 (44%) i TLR5 rs5744174 (44%).

Gen za TLR1 smješten je na 4. kromosomu, a testirani polimorfni biljezi rs5743611, rs4833095 i rs3923647 nalaze se u domeni ponavljanja bogatih leucinom (eng. LRRs, *Leucine-rich repeats*). Polimorfizam rs5743611 karakterizira promjena nukleotida G u nukleotid C, što na proteinskom nivou dovodi do zamjene aminokiseline arginina u treonin (R80T). Polimorfizam rs4833095 karakterizira promjena nukleotida T u nukleotid C što dovodi do zamjene asparagine u serin (N248S), a promjena nukleotida A u nukleotid T, koja karakterizira polimorfizam rs3923647 rezultira zamjenom histidina u leucin (H305L). Gen za TLR6 smješten je na 4. kromosomu, a testirani polimorfni biljeg rs57483810, kojeg karakterizira zamjena nukleotida C u nukleotid T, što dovodi do promjene proteina zbog zamjene serina prolinom (S249P), nalazi se također unutar LRR regije ekstracelularne domene receptora. Gen za TLR2 smješten na 4. kromosomu, a testirani polimorfni biljeg rs13150331, kojeg karakterizira ga promjena nukleotida A u nukleotid G, nalazi se u promotorskoj regiji. Područje promotora je sekvenca koja se obično odnosi na onu neposredno uz mjesto gdje će se gen prepisati. U promotorskoj regiji gena TLR5, čiji je lokus na 1. kromosomu, nalazi se polimorfizam rs725084 sa promjenom nukleotida T u nukleotid C, dok se u promotorskoj regiji gena TLR9, čiji je lokus na 3. kromosomu, nalazi se polimorfizam rs352139 sa promjenom nukleotida G u

nukleotid A. Među egzonske polimorfizme, odnosno one unutar kodirajuće sekvence gena pripadaju polimorfizmi rs5743704 i rs5743708 gena za TLR2 na 4. kromosomu, polimorfizam rs4986790 gena za TLR4 na 9. kromosomu, te polimorfizmi rs2072493, rs5744174 i rs5744168 gena za TLR5 na 1. kromosomu. Promjene nukleotida koje karakteriziraju navedene polimorfizme dovode do promjena proteina zbog zamjenjenih aminokiselina: prolina za histidin kod rs5743704 (P631H), arginine za glutamin kod rs5743708 (R753Q), aspartata za glicin kod rs4986790 (D299G), asparagina za serin kod rs2072493 (N592S) i fenilalanina za leucin kod rs5744174 (F616L). Promjena nukleotida C u nukleotid T polimorfizma rs5744168 u TLR5 genu kodira stop kodon što rezultira prekidom procesa prevođenja proteina.

**Tablica 5.** TLR genski polimorfizmi obzirom na njihovu lokalizaciju, frekvenciju alela, karakteriziranom promjenom nukleotida i funkcijom: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

Gen	SNP	Kromosom	Aleli	Domena	MAF CEU <sup>a</sup>	Promjena proteina
TLR1	rs5743611	4	G/C	LRR	0,13	R80T
TLR1	rs4833095	4	T/C	LRR	0,22	N248S
TLR1	rs3923647	4	A/T	LRR	0,03	H305L
TLR2	rs13150331	4	A/G	Promotor	0,39	-
TLR2	rs5743704	4	A/C	Egzon	0,05	P631H
TLR2	rs5743708	4	A/G	Egzon	0,05	R753Q
TLR4	rs4986790	9	A/G	Egzon	0,06	D299G
TLR5	rs2072493	1	A/G	Egzon	0,15	N592S
TLR5	rs5744168	1	C/T	Egzon	0,03	Stop (C>T)
TLR5	rs5744174	1	C/T	Egzon	0,44	F616L
TLR5	rs725084	1	T/C	Promotor	0,44	-
TLR6	rs5743810	4	C/T	LRR	0,41	S249P
TLR9	rs352139	3	G/A	Promotor	0,48	-

MAF= Frekvencija minornog alela, CEU= Podrijetlo iz sjeverne i zapadne Europe.

### 5.3 Učinak SNP-a na rizik razvoja karcinoma pluća

Cilj ovih analiza bio je ispitati genetičku varijabilnost receptora urođene imunosti kod ispitanika koji imaju dijagnosticiran KOPB i karcinom pluća, te istražiti vezu između genotipova i razvoja karcinoma pluća u bolesnika sa KOPB-om. Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 13 polimorfni biljega smještenih u 6 različitih gena koji kodiraju za TLR-e. Ovo je analitička opservacijska studija slučajeva (eng. *case-only*) dizajnirana za utvrđivanje utjecaja genetskih čimbenika na bolest, koristeći podatke samo o oboljelim pojedincima (slučajevima). Prevalentni slučajevi raspoređeni su u tri skupine: 1. bolesnici sa izoliranim KOPB-om, 2. bolesnici sa KOPB-om i karcinomom pluća i 3. bolesnici samo sa karcinomom pluća. Kako bi se pronašla statistički značajna razlika, uspoređena je distribucija frekvencije određenog polimorfizma među tri odabrane skupine. Izdvojeni su oni polimorfizmi čija se distribucija alela statistički značajno razlikovala među skupinama ( $p < 0,05$  za Fisher-Freeman-Haltonov test). Modelom logističke regresije utvrđena je povezanost između izdvojenih polimorfizama i kategoriziranih skupina. Ishod ili zavisnu varijablu predstavlja pripadnost skupini dok nezavisnu ili eksplanatornu varijablu predstavljaju kombinacije alela (AA, AB, BB). Mjeru učinka tog SNP-a na rizik razvoja karcinoma pluća u prisutnosti KOPB-a izražena je pomoću omjera izgleda (eng. OR, *Odds Ratio*).

### 5.3.1 Rezultati analize povezanosti polimorfizama u genima za TLR-e kod ispitanika sa KOPB-om i karcinomom pluća

Cilj ove analize bio je ispitati postoji li značajna povezanost između povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća među nositeljima određenog genotipa. U ovu analizu bili su uključeni ispitanici koji su imali dijagnosticiran karcinom pluća (KP) i ispitanici sa dijagnosticiranim KOPB-om koji su služili kao kontrola (Tablica 6). Kada je uspoređivana učestalost testiranih SNP-ova TLR genotipova između bolesnika sa karcinomom pluća i bolesnika sa KOPB-om, utvrđene su statistički značajne razlike u raspodjeli genotipova TLR5 rs2072493 i rs725084. Za TLR5 rs2072493 otkriveno je da je minorni alel povezan s povećanim rizikom od razvoja karcinoma pluća (G/A + G/G OR = 1,60 [1,08-2,36] P=0,020). Za TLR5 rs725084 uočena je granična povezanost heterozigotnog alela s povećanim rizikom od razvoja karcinoma pluća (C/T OR = 1,58 [1,00-2,49] P=0,050). Statistička obrada rezultata genotipizacije ostalih polimorfni biljega pokazala je da ne postoji značajna razlika u raspodjeli genotipova, kao što je prikazano u Tablici 6.

**Tablica 6.** Povezanost TLR polimorfizama i razvoja karcinoma pluća između ispitanika koji imaju izolirani KOPB (kontrola) i onih koji imaju samo karcinom pluća (KP), bez KOPB-a: binarna logistička regresija (bez prilagodbe na dob i spol)

Referentni SNP	Genotip	KP vs KOPB			
		KP	KOPB	OR (95% CI)	P
TLR1_rs5743611	G/G	111(68,94%)	231(75,99%)	1	
	C/G	43(26,71%)	66(21,71%)	1,36(0,87-2,12)	0,180
	C/C	7(4,35%)	7(2,30%)	2,08(0,71-6,08)	0,180
	C/G + C/C	50(31,06%)	73(24,01%)	1,43(0,93-2,18)	0,100
TLR1_rs4833095	T/T	80(49,38%)	145(47,70%)	1	
	C/T	73(45,06%)	130(42,76%)	1,02(0,69-1,51)	0,930
	C/C	9(5,56%)	29(9,54%)	0,56(0,25-1,25)	0,160
	C/T + C/C	82(50,62%)	159(52,30%)	0,93(0,64-1,37)	0,730
TLR1_rs3923647	A/A	152(93,83%)	284(93,11%)	1	
	A/T	10(6,17%)	21(6,89%)	0,89(0,41-1,94)	0,770
	T/T	-	-	-	-
	A/T + T/T	10(6,17%)	21(6,89%)	0,89(0,41-1,94)	0,770
TLR2_rs13150331	A/A	59(36,88%)	120(39,87%)	1	
	A/G	74(46,25%)	128(42,52%)	1,18(0,77-1,80)	0,450
	G/G	27(16,88%)	53(17,61%)	1,04(0,59-1,81)	0,900
	G/A + G/G	101(63,13%)	181(60,13%)	1,13(0,76-1,69)	0,530
TLR2_rs_5743704	C/C	147(93,04%)	274(91,33%)	1	
	A/C	11(6,96%)	26(8,67%)	0,79(0,38-1,64)	0,530
	A/A	-	-	-	-
	A/C + A/A	11(6,96%)	26(8,67%)	0,79(0,38-1,64)	0,530
TLR2_rs5743708	G/G	154(95,65%)	292(95,42%)	1	
	A/G	7(4,35%)	14(4,58%)	0,95(0,37-2,40)	0,910
	A/A	-	-	-	-
	A/G + A/A	7(4,35%)	14(4,58%)	0,95(0,37-2,40)	0,910
TLR4_rs4986790	A/A	136(83,95%)	264(87,13%)	1	
	A/G	26(16,05%)	38(12,54%)	1,33(0,77-2,28)	0,300
	G/G	0(0,00%)	1(0,33%)	0,00(0,00-1)	0,990
	G/A + G/G	26(16,05%)	39(12,87%)	1,29(0,76-2,22)	0,350
TLR5_rs2072493	A/A	83(52,20%)	190(63,55%)	1	
	A/G	63(39,62%)	97(32,44%)	1,49(0,99-2,24)	0,060
	G/G	13(8,18%)	12(4,01%)	2,48(1,09-5,66)	<b>0,030</b>
	G/A + G/G	76(47,80%)	109(36,45%)	1,60(1,08-2,36)	<b>0,020</b>
TLR5_rs5744168	C/C	149(92,55%)	275(90,16%)	1	
	C/T	12(7,45%)	30(9,84%)	0,74(0,37-1,48)	0,390
	T/T	-	-	-	-
	C/T + T/T	12(7,45%)	30(9,84%)	0,74(0,37-1,48)	0,390
TLR5_rs5744174	T/T	51(31,88%)	107(35,43%)	1	
	C/T	82(51,25%)	120(39,74%)	1,43(0,93-2,22)	0,110
	C/C	27(16,88%)	75(24,83%)	0,76(0,43-1,31)	0,320
	C/T + C/C	109(68,13%)	195(64,57%)	1,17(0,78-1,76)	0,440
TLR5_rs725084	T/T	41(25,47%)	101(33,44%)	1	
	C/T	84(52,17%)	131(43,38%)	1,58(1,00-2,49)	<b>0,050</b>
	C/C	36(22,36%)	70(23,18%)	1,27(0,74-2,18)	0,390
	C/T + C/C	120(74,53%)	201(66,56%)	1,47(0,96-2,26)	0,080
TLR6_rs5743810	C/C	75(46,58%)	142(46,71%)	1	
	C/T	72(44,72%)	136(44,74%)	1,00(0,67-1,50)	0,990
	T/T	14(8,70%)	26(8,55%)	1,02(0,50-2,07)	0,960
	C/T + T/T	86(53,42%)	162(53,29%)	1,01(0,69-1,47)	0,980
TLR9_rs352139	G/G	58(36,02%)	111(36,51%)	1	
	A/G	75(46,58%)	152(50,00%)	0,94(0,62-1,44)	0,790
	A/A	28(17,39%)	41(13,49%)	1,31(0,73-2,32)	0,360
	A/G + A/A	103(63,98%)	193(63,49%)	1,02(0,69-1,52)	0,920

### 5.3.2 Rezultati analize povezanosti polimorfizama u genima za TLR-e kod ispitanika sa KOPB-om i ispitanika sa KOPB-om i karcinomom pluća

Cilj ove analize bio je ispitati postojati li povezanost između određenog genotipa TLR-a i povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća u prisutnosti KOPB-a. Slučajeve u ovoj analizi predstavljaju ispitanici kojima su dijagnosticirani KOPB i karcinoma pluća, dok su kontrole ispitanici sa izloranim KOPB-om (Tablica 7). Kada je uspoređena raspodjela genotipa u skupini bolesnika sa KOPB-om i karcinomom pluća u odnosu na bolesnike samo sa KOPB-om, primijećeno je da su genotipovi TLR1 rs5743611 i TLR5 rs2072493 marginalno povezani sa razvojem karcinoma pluća u bolesnika sa KOPB-om, dok je genotip TLR9 rs352139 marginalno povezan sa zaštitnom funkcijom u razvoju karcinoma pluća kod istih. Za TLR1 rs5743611 i TLR5 rs2072493 otkriveno je da je prisutnost minornog alela povezana sa povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća (rs5743611 C/G + C/C OR=1,55 [1,05-2,28] P=0,030; rs2072493 G/G OR=2,82 [1,34-5,94] P=0,010). Za TLR9 pronađena je granična povezanost heterozigotnosti rs352139 sa protektivnim učinkom na nastanak karcinoma pluća (A/G OR = 0,68 [0,46-1,00] P=0,050). Kao što je prikazano Tablici 7, usporedbom unutar opisanih skupina nisu pronađene statistički značajne razlike za preostale analizirane genotipove polimorfnih biljega.

**Tablica 7.** Povezanost između TLR polimorfizama i razvoja karcinoma pluća između ispitanika koji imaju izolirani KOPB (kontrola) i onih koji imaju karcinom pluća (KP) i KOPB: binarna logistička regresija (bez prilagodbe na dob i spol)

Referentni SNP	Genotip	KOPB+KP vs KOPB			
		KOPB + KP	KOPB	OR (95% CI)	P
TLR1_rs5743611	G/G	145(67,13%)	231(75,99%)	1	
	C/G	62(28,70%)	66(21,71%)	1,50(1,00-2,24)	<b>0,050</b>
	C/C	9(4,17%)	7(2,30%)	2,05(0,75-5,62)	0,160
	C/G + C/C	71(32,87%)	73(24,01%)	1,55(1,05-2,28)	<b>0,030</b>
TLR1_rs4833095	T/T	103(47,69%)	145(47,70%)	1	
	C/T	97(44,91%)	130(42,76%)	1,05(0,73-1,51)	0,790
	C/C	16(7,41%)	29(9,54%)	0,78(0,40-1,50)	0,450
	C/T + C/C	113(52,31%)	159(52,30%)	1,00(0,71-1,42)	1,000
TLR1_rs3923647	A/A	207(94,52%)	284(93,11%)	1	
	A/T	12(5,48%)	21(6,89%)	0,78(0,38-1,63)	0,510
	T/T	-	-	-	-
	A/T + T/T	12(5,48%)	21(6,89%)	0,78(0,38-1,63)	0,510
TLR2_rs13150331	A/A	88(41,12%)	120(39,87%)	1	
	A/G	91(42,52%)	128(42,52%)	0,97(0,66-1,42)	0,870
	G/G	35(16,36%)	53(17,61%)	0,90(0,54-1,50)	0,690
	G/A + G/G	126(58,88%)	181(60,13%)	0,95(0,66-1,36)	0,770
TLR2_rs_5743704	C/C	198(91,67%)	274(91,33%)	1	
	A/C	18(8,33%)	26(8,67%)	0,96(0,51-1,80)	0,890
	A/A	-	-	-	-
	A/C + A/A	18(8,33%)	26(8,67%)	0,96(0,51-1,80)	0,890
TLR2_rs5743708	G/G	210(97,22%)	292(95,42%)	1	
	A/G	6(2,78%)	14(4,58%)	0,60(0,23-1,58)	0,300
	A/A	-	-	-	-
	A/G + A/A	6(2,78%)	14(4,58%)	0,60(0,23-1,58)	0,300
TLR4_rs4986790	A/A	189(86,70%)	264(87,13%)	1	
	A/G	28(12,84%)	38(12,54%)	1,03(0,61-1,74)	0,910
	G/G	1(0,46%)	1(0,33%)	1,40(0,09-22,47)	0,810
	G/A + G/G	29(13,30%)	39(12,87%)	1,04(0,62-1,74)	0,890
TLR5_rs2072493	A/A	118(54,38%)	190(63,55%)	1	
	A/G	78(35,94%)	97(32,44%)	1,29(0,89-1,89)	0,180
	G/G	21(9,68%)	12(4,01%)	2,82(1,34-5,94)	<b>0,010</b>
	G/A + G/G	99(45,62%)	109(36,45%)	1,46(1,02-2,09)	<b>0,040</b>
TLR5_rs5744168	C/C	201(92,63%)	275(90,16%)	1	
	C/T	16(7,37%)	30(9,84%)	0,73(0,39-1,37)	0,330
	T/T	-	-	-	-
	C/T + T/T	16(7,37%)	30(9,84%)	0,73(0,39-1,37)	0,330
TLR5_rs5744174	T/T	78(35,94%)	107(35,43%)	1	
	C/T	100(46,08%)	120(39,74%)	1,14(0,77-1,70)	0,510
	C/C	39(17,97%)	75(24,83%)	0,71(0,44-1,16)	0,170
	C/T + C/C	139(64,06%)	195(64,57%)	0,98(0,68-1,41)	0,900
TLR5_rs725084	T/T	69(32,09%)	101(33,44%)	1	
	C/T	106(49,30%)	131(43,38%)	1,18(0,79-1,77)	0,410
	C/C	40(18,60%)	70(23,18%)	0,84(0,51-1,37)	0,480
	C/T + C/C	146(67,91%)	201(66,56%)	1,06(0,73-1,54)	0,750
TLR6_rs5743810	C/C	97(45,12%)	142(46,71%)	1	
	C/T	97(45,12%)	136(44,74%)	1,04(0,72-1,51)	0,820
	T/T	21(9,77%)	26(8,55%)	1,18(0,63-2,22)	0,600
	C/T + T/T	118(54,88%)	162(53,29%)	1,07(0,75-1,51)	0,720
TLR9_rs352139	G/G	89(41,01%)	111(36,51%)	1	
	A/G	83(38,25%)	152(50,00%)	0,68(0,46-1,00)	<b>0,050</b>
	A/A	45(20,74%)	41(13,49%)	1,37(0,82-2,27)	0,220
	A/G + A/A	128(58,99%)	193(63,49%)	0,83(0,58-1,18)	0,300



### 5.3.3 Rezultati analize povezanosti polimorfizama u genima za TLR-e kod ispitanika sa karcinomom pluća i ispitanika sa KOPB-om i karcinomom pluća

Cilj ove analize bio je ispitati postoji li statistički značajna povezanost u učestalosti genotipova kada se uspoređuju skupine bolesnika samo sa karcinomom pluća i onih sa KOPB-om i karcinomom pluća. Korelacijom ispitanika kontrolne skupine (bolesnici samo sa karcinomom pluća) i ispitanika koji boluju od KOPB-a i karcinoma pluća nije uočen statistički značajnije zastupljen genotip. Odnosno, u ovim dvjema skupinama ispitanika raspodjela alela analiziranih polimorfizama nije se značajno razlikovala ( $p > 0,05$  za Fisher-Freeman-Haltonov test), kako je prikazano u Tablici 8.

**Tablica 8.** Povezanost između TLR polimorfizama i razvoja karcinoma pluća između ispitanika koji imaju izoliran karcinom pluća (KP) i onih koji imaju karcinom pluća i KOPB: binarna logistička regresija (bez prilagodbe na dob i spol)

Referentni SNP	Genotip	KP vs KOPB+KP			
		KP	KOPB + KP	OR (95% CI)	p
TLR1_rs5743611	G/G	111(68,94%)	145(67,13%)	1	
	C/G	43(26,71%)	62(28,70%)	0,91(0,57-1,44)	0,670
	C/C	7(4,35%)	9(4,17%)	1,02(0,37-2,81)	0,980
	C/G + C/C	50(31,06%)	71(32,87%)	0,92(0,59-1,43)	0,710
TLR1_rs4833095	T/T	80(49,38%)	103(47,69%)	1	
	C/T	73(45,06%)	97(44,91%)	0,97(0,64-1,48)	0,880
	C/C	9(5,56%)	16(7,41%)	0,72(0,30-1,72)	0,470
	C/T + C/C	82(50,62%)	113(52,31%)	0,93(0,62-1,40)	0,740
TLR1_rs3923647	A/A	152(93,83%)	207(94,52%)	1	
	A/T	10(6,17%)	12(5,48%)	1,13(0,48-2,70)	0,770
	T/T	-	-	-	-
	A/T + T/T	10(6,17%)	12(5,48%)	1,13(0,48-2,70)	0,770
TLR2_rs13150331	A/A	59(36,88%)	88(41,12%)	1	
	A/G	74(46,25%)	91(42,52%)	1,21(0,77-1,90)	0,400
	G/G	27(16,88%)	35(16,36%)	1,15(0,63-2,10)	0,650
	G/A + G/G	101(63,13%)	126(58,88%)	1,20(0,78-1,82)	0,410
TLR2_rs_5743704	C/C	147(93,04%)	198(91,67%)	1	
	A/C	11(6,96%)	18(8,33%)	0,82(0,38-1,80)	0,620
	A/A	-	-	-	-
	A/C + A/A	11(6,96%)	18(8,33%)	0,82(0,38-1,80)	0,620
TLR2_rs5743708	G/G	154(95,65%)	210(97,22%)	1	
	A/G	7(4,35%)	6(2,78%)	1,59(0,52-4,83)	0,410
	A/A	-	-	-	-
	A/G + A/A	7(4,35%)	6(2,78%)	1,59(0,52-4,83)	0,410
TLR4_rs4986790	A/A	136(83,95%)	189(86,70%)	1	
	A/G	26(16,05%)	28(12,84%)	1,29(0,72-2,30)	0,390
	G/G	0(0,00%)	1(0,46%)	0,00(0,00-1)	0,990
	G/A + G/G	26(16,05%)	29(13,30%)	1,25(0,70-2,21)	0,450
TLR5_rs2072493	A/A	83(52,20%)	118(54,38%)	1	
	A/G	63(39,62%)	78(35,94%)	1,15(0,74-1,77)	0,530
	G/G	13(8,18%)	21(9,68%)	0,88(0,42-1,86)	0,740
	G/A + G/G	76(47,80%)	99(45,62%)	1,09(0,72-1,64)	0,680
TLR5_rs5744168	C/C	149(92,55%)	201(92,63%)	1	
	C/T	12(7,45%)	16(7,37%)	1,01(0,46-2,20)	0,980
	T/T	-	-	-	-
	C/T + T/T	12(7,45%)	16(7,37%)	1,01(0,46-2,20)	0,980
TLR5_rs5744174	T/T	51(31,88%)	78(35,94%)	1	
	C/T	82(51,25%)	100(46,08%)	1,25(0,79-1,98)	0,330
	C/C	27(16,88%)	39(17,97%)	1,06(0,58-1,94)	0,850
	C/T + C/C	109(68,13%)	139(64,06%)	1,20(0,78-1,85)	0,410
TLR5_rs725084	T/T	41(25,47%)	69(32,09%)	1	
	C/T	84(52,17%)	106(49,30%)	1,33(0,82-2,16)	0,240
	C/C	36(22,36%)	40(18,60%)	1,51(0,84-2,74)	0,170
	C/T + C/C	120(74,53%)	146(67,91%)	1,38(0,88-2,18)	0,160
TLR6_rs5743810	C/C	75(46,58%)	97(45,12%)	1	
	C/T	72(44,72%)	97(45,12%)	0,96(0,63-1,47)	0,850
	T/T	14(8,70%)	21(9,77%)	0,86(0,41-1,81)	0,690
	C/T + T/T	86(53,42%)	118(54,88%)	0,94(0,63-1,42)	0,780
TLR9_rs352139	G/G	58(36,02%)	89(41,01%)	1	
	A/G	75(46,58%)	83(38,25%)	1,39(0,88-2,19)	0,160
	A/A	28(17,39%)	45(20,74%)	0,95(0,54-1,70)	0,870
	A/G + A/A	103(63,98%)	128(58,99%)	1,23(0,81-1,88)	0,330

## 5.4 Učinak SNP-a na rizik razvoja karcinoma pluća nakon prilagodbe na dob i spol

Analiza povezanosti genotipova i rizika za razvoj karcinoma pluća bez korekcije prema spolu i dobi istaknula je 5 polimorfni biljega čija se raspodjela alela značajno razlikovala ( $p < 0,05$  za Fisher-Freeman-Haltonov test) među definiranim skupinama ispitanika. Polimorfizmi za koje se tom neprilagođenom analizom dokazala povezanost sa povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća su: TLR1 rs5743611, TLR5 rs2072493, TLR5 rs5744174, TLR5 rs725084 i TLR9 rs352139. Navedeni SNP-ovi ponovno su analizirani na povećanom broju uzoraka sa dodatnom korekcijom prema dobi i spolu. S obzirom da su većina ispitanika uključenih u ovo istraživanje pušači (Tablica 1), utecaj varijable pušenja nema statistički značaj na adaptaciju modela. Statističkom obradom učestalosti genotipova prilagođene na spol i dob ispitanika isključila se mogućnost utjecaja spolnih i dobnih razlika na povezanost između povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća među nositeljima određenog genotipa. P vrijednosti su se smatrale značajnima pri  $p \leq 0,05$ , s razinom značajnosti za cijelu studiju pri  $p \leq 0,0038$  uzimajući u obzir Bonferronijevu korekciju za višestruko ispitivanje. Analiza odabranih SNP-ova, povezanih sa definiranim skupinama pacijenata u prvom krugu testa, na povećanom broju uzoraka, kontrolirana na dob i spol pacijenata prikazana je u Tablicama 9-11.

Korelacija ispitanika kontrolne skupine (bolesnici samo sa KOPB-om) i ispitanika koji boluju od karcinoma pluća prikazana je u Tablici 9. Kada je uspoređena učestalost genotipa odabranih 5 SNP-ova između bolesnika sa KOPB-om i izoliranim karcinomom pluća, otkriveno je da je minorni alel istog SNP-a TLR5 rs2072493 značajno povezan sa razvojem karcinoma pluća (G/A + G/G OR = 1,71 [1,20- 2,43] P=0,003).

**Tablica 9.** Povezanost između TLR polimorfizama i razvoja karcinoma pluća između ispitanika koji imaju izolirani KOPB (kontrola) i onih koji imaju karcinom pluća (KP): binarna logistička regresija (prilagođeno na dob i spol)

Referentni SNP	Genotip	KP vs KOPB			
		KP	KOPB	OR (95% CI)	P
TLR1_rs5743611	G/G	140 (67,96%)	311(74,05%)	1	
	G/C	57 (27,67%)	95(22,62%)	1,30(0,88-1,93)	0,180
	C/C	9 (4,37%)	14(3,33%)	1,25(0,52-3,01)	0,620
	G/C + C/C	66 (32,04%)	109(25,95%)	1,30(0,89-1,88)	0,170
TLR5_rs5744174	T/T	65 (32,02%)	141(33,65%)	1	
	C/T	99 (48,77%)	188(44,87%)	1,15(0,78-1,69)	0,480
	C/C	39 (19,21%)	90(21,48%)	0,97(0,60-1,57)	0,900
	C/T + C/C	138 (67,98%)	278(66,35%)	1,09(0,76-1,57)	0,640
TLR5_rs2072493	A/A	115 (56,65%)	284(68,77%)	1	
	G/A	73 (35,96%)	118(28,57%)	1,55(1,07-2,25)	<b>0,020</b>
	G/G	15 (7,39%)	11(2,66%)	3,27(1,44-7,43)	<b>0,010</b>
	G/A + G/G	88 (43,35%)	129(31,23%)	1,71(1,20-2,43)	<b>0,003</b>
TLR5_rs725084	T/T	52 (25,24%)	136(32,69%)	1	
	C/T	104 (50,49%)	192(46,15%)	1,41(0,94-2,11)	0,100
	C/C	50 (24,27%)	88(21,15%)	1,47(0,91-2,38)	0,110
	C/T + C/C	154 (74,76%)	280(67,31%)	1,43(0,97-2,09)	0,070
TLR9_rs352139	G/G	71 (34,80%)	148(36,82%)	1	
	G/A	97 (47,55%)	196(48,76%)	1,05(0,72-1,53)	0,810
	A/A	36 (17,65%)	58(14,43%)	1,29(0,77-2,15)	0,330
	G/A + A/A	133 (65,20%)	254(63,18%)	1,10(0,77-1,58)	0,590

Daljnja analiza provedena je za slučajeve ispitanika kojima su dijagnosticirani KOPB i karcinoma pluća i njihovim kontrolama - ispitanicima sa izoliranom dijagnozom KOPB-a. Otkriveno je da je samo TLR5 rs2072493 koji kodira polimorfizam statistički značajno povezan s rizikom za razvoj karcinoma pluća u skupini pacijenata sa KOPB-om. Učestalost minornog alela TLR5 rs2072493 bila je statistički značajno povezana sa karcinomom pluća kada su podaci logističke regresije prilagođeni dobi i spolu (G/A + G/G OR=1,76 [1,26-2,46] P<0,001; G/G OR = 4,37 [2,03-9,45] P<0,001). Navedeni rezultati prikazani su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Povezanost između TLR polimorfizama i razvoja karcinoma pluća između ispitanika koji imaju izolirani KOPB (kontrola) i onih koji imaju karcinom pluća (KP) i KOPB: binarna logistička regresija (prilagođeno na dob i spol)

Referentni SNP	Genotip	KOPB+KP vs KOPB			
		KOPB + KP	KOPB	OR (95% CI)	p
TLR1_rs5743611	G/G	171(69,51%)	311(74,05%)	1	
	G/C	67(27,24%)	95(22,62%)	1,30(0,90-1,88)	0,170
	C/C	8(3,25%)	14(3,33%)	1,05(0,42-2,60)	0,920
	G/C + C/C	75(30,49%)	109(25,95%)	1,27(0,89-1,81)	0,190
TLR5_rs5744174	T/T	88(35,48%)	141(33,65%)	1	
	C/T	116(46,77%)	188(44,87%)	0,97(0,68-1,39)	0,870
	C/C	44(17,74%)	90(21,48%)	0,81(0,51-1,29)	0,370
	C/T + C/C	160(64,52%)	278(66,35%)	0,92(0,66-1,29)	0,630
TLR5_rs2072493	A/A	139(56,28%)	284(68,77%)	1	
	G/A	86(34,82%)	118(28,57%)	1,52(1,07-2,17)	<b>0,020</b>
	G/G	22(8,91%)	11(2,66%)	4,37(2,03-9,45)	<b>&lt;0,001</b>
	G/A + G/G	108(43,72%)	129(31,23%)	1,76(1,26-2,46)	<b>0,001</b>
TLR5_rs725084	T/T	80(32,65%)	136(32,69%)	1	
	C/T	122(49,80%)	192(46,15%)	1,02(0,71-1,48)	0,900
	C/C	43(17,55%)	88(21,15%)	0,85(0,53-1,35)	0,490
	C/T + C/C	165(67,35%)	280(67,31%)	0,97(0,69-1,37)	0,870
TLR9_rs352139	G/G	102(41,30%)	148(36,82%)	1	
	G/A	95(38,46%)	196(48,76%)	0,73(0,51-1,04)	0,080
	A/A	50(20,24%)	58(14,43%)	1,19(0,75-1,89)	0,460
	G/A + A/A	145(58,70%)	254(63,18%)	0,84(0,60-1,17)	0,300

Ponovljenom analizom učestalosti odabranih SNP-ova, prilagođenom na spol i dob ispitanika samo sa karcinomom pluća i onih sa KOBP-om i karcinomom pluća, nije uočena statistički značajna povezanost niti jednog testiranog SNP-a osim TLR5 rs725084 gdje varijanta C/C povećava rizik s OR=1,84 [1,06- 3,19] P=0,030. Rezultati su prikazani u Tablici 11.

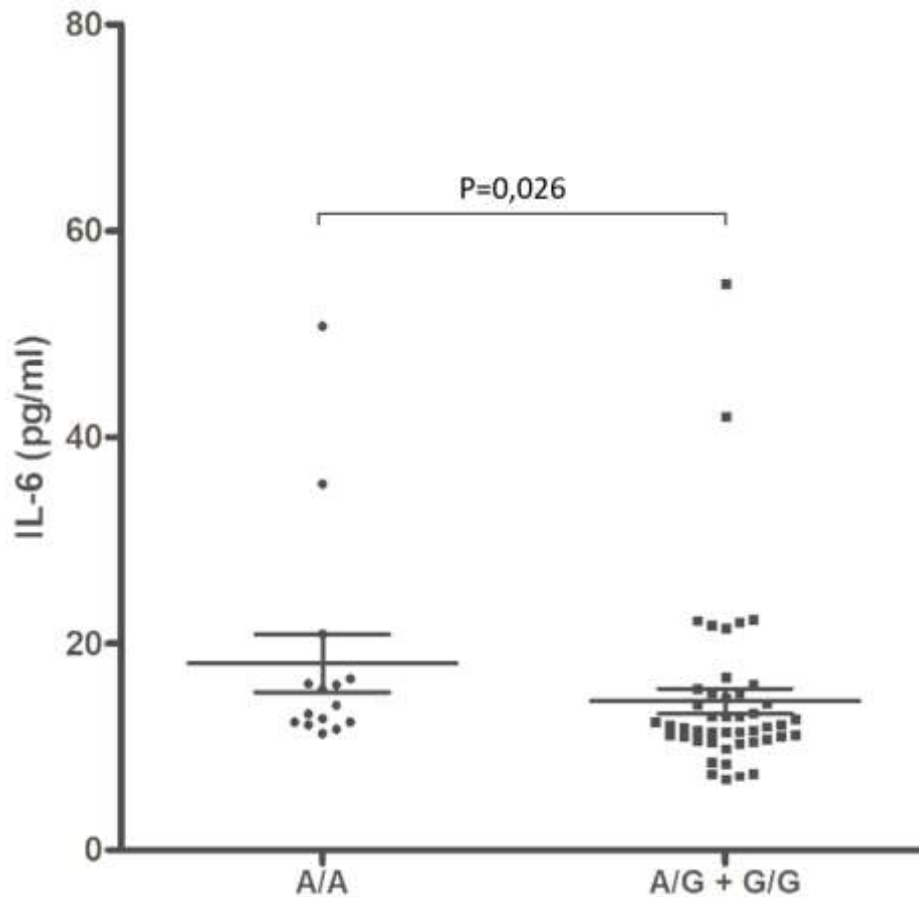
**Tablica 11.** Povezanost između TLR polimorfizama i razvoja karcinoma pluća između ispitanika koji imaju izoliran karcinom pluća (KP) i onih koji imaju karcinom pluća i KOPB: binarna logistička regresija (prilagođeno na dob i spol)

Referentni SNP	Genotip	KP vs KOPB+KP			
		KP	KOPB + KP	OR (95% CI)	P
TLR1_rs5743611	G/G	140(67,96%)	171(69,51%)	1	
	G/C	57(27,67%)	67(27,24%)	1,05(0,69-1,61)	0,820
	C/C	9(4,37%)	8(3,25%)	1,03(0,37-2,83)	0,960
	G/C + C/C	66(32,04%)	75(30,49%)	1,05(0,70-1,58)	0,820
TLR5_rs5744174	T/T	65(32,02%)	88(35,48%)	1	
	C/T	99(48,77%)	116(46,77%)	1,18(0,77-1,82)	0,440
	C/C	39(19,21%)	44(17,74%)	1,20(0,69-2,08)	0,510
	C/T + C/C	138(67,98%)	160(64,52%)	1,19(0,79-1,78)	0,400
TLR5_rs2072493	A/A	115(56,65%)	139(56,28%)	1	
	G/A	73(35,96%)	86(34,82%)	1,06(0,70-1,59)	0,790
	G/G	15(7,39%)	22(8,91%)	0,73(0,35-1,49)	0,390
	G/A + G/G	88(43,35%)	108(43,72%)	0,99(0,67-1,44)	0,940
TLR5_rs725084	T/T	52(25,24%)	80(32,65%)	1	
	C/T	104(50,49%)	122(49,80%)	1,37(0,87-2,14)	0,170
	C/C	50(24,27%)	43(17,55%)	1,84(1,06-3,19)	<b>0,030</b>
	C/T + C/C	154(74,76%)	165(67,35%)	1,49(0,98-2,28)	0,060
TLR9_rs352139	G/G	71(34,80%)	102(41,30%)	1	
	G/A	97(47,55%)	95(38,46%)	1,44(0,94-2,20)	0,090
	A/A	36(17,65%)	50(20,24%)	1,12(0,66-1,92)	0,680
	G/A + A/A	133(65,20%)	145(58,70%)	1,33(0,90-1,97)	0,150

## 5.5 SNP rs2072493 gena TLR 5 i koncentracija IL-6 u serumu

Obzirom na činjenicu da su rezultati analize povezanosti genotipova i rizika za razvoj bolesti istaknule polimorfizam TLR5 rs2072493 kao statistički značajno povezan s razvojem karcinoma pluća odabran je za daljnju funkcionalnu analizu. U svrhu određivanja indirektno funkcionalne značajnosti navedenog polimorfizma, korištenjem ELISA testa (eBioscience, San Diego, SAD) analizirana je koncentracija IL-6 u serumima heterozigotnih i homozigotnih nosioca polimorfizma rs2072493 gena TLR5. Poznato je da je sistemna posljedica poticanja signalizacije ovisne o TLR5 proizvodnja proinflamatornog citokina IL-6 (144).

Istraženo je da li prisutnost SNP-a rs2072493 gena za TLR5, za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za razvoj karcinoma pluća u prisutnosti KOBP-a, utječe na koncentraciju IL-6 u serumu ispitanika. Histogram prikazuje odnos koncentracije IL-6 i alelnih varijanti polimorfizma rs2072493 TLR 5 (Slika 9). Prikazana je distribucija heterozigotnih i homozigotnih nosioca oba varijantna alela, te značajna međusobna razlika u serumskoj koncentraciji IL-6 nosioca. Postoji značajna razlika u koncentraciji IL-6: značajno su više koncentracije IL-6 kod varijante AA u odnosu na A/G + G/G,  $P=0,026$ .



**Slika 9.** SNP rs2072493 gena TLR 5 i koncentracija IL-6 u serumu

Histogram prikazuje odnos koncentracije IL-6 i alelnih varijanti polimorfizma rs2072493 TLR 5. Serum je izoliran iz periferne krvi ispitanika s poznatim genotipom. Koncentracija IL-6 u serumima ispitanika određena je metodom ELISA prema uputi proizvođača (detaljno opisano u Materijalima i metodama). Rezultati su prikazani kao vrijednosti koncentracije u pg/ml, a mjerenja su rađena u duplikatu. Mjerenja su tri puta ponavljana, a slika prikazuje jedno od mjerenja. Stupac standardne pogreške (eng. *error bar*) prikazuje varijabilnost +/- SEM (eng. *Standard Error of the Mean*) duplikata izmjerenih u jednom mjerenju.



## 5.6 Povezanost polimorfizama gena TLR5 sa težinom KOPB-a i stadijem karcinoma pluća

Cilj ove analize bio je ispitati povezanost analiziranih polimorfizama sa kliničkim karakteristikama ispitanika. S obzirom na činjenicu da se polimorfni biljeg gena TLR5 rs2072493 pokazao kao značajno povezan s rizikom za razvoj karcinoma pluća kod pacijenata sa KOPB-om, za SNP-ove TLR5 rs2072493, TLR5 rs725084 i TLR5 rs5744174 je analizirano postoji li njihova značajna povezanost sa stadijem KOPB-a i stadijem karcinoma pluća. Hi-kvadrat testom ispitani su odnosi polimorfizama TLR5 rs2072493, TLR5 rs725084 i TLR5 rs5744174 sa stadijem KOPB-a prema GOLD klasifikaciji (od najblažeg do najtežeg stadija: A → B → C → D) i prema vrijednostima FEV1, te sa stadijem karcinoma pluća prema TNM klasifikaciji (stadij 1, 2, 3 i 4). Hi-kvadrat test služi potvrdi da li opažene frekvencije odstupaju od frekvencija koje bismo očekivali pod određenom hipotezom. Kod ovog testa istraženo je postoji li povezanost između kliničkog parametra (GOLD, FEV1 i stadij karcinoma) i genotipa gore navedenih polimorfizma, te je pokazana vjerojatnost povezanosti. U tablici kontingencije očekivana frekvencija izračunata je tako da je umnožak sume redaka (eng. RT, *Row Total*) i sume stupaca (eng. CT, *Column Total*) podijeljen sa ukupnom sumom (eng. GT, *Grand Total*). Princip GOLD i TNM klasifikacije ispitanika detaljno su opisani u Materijalima i metodama. Težina opstrukcije dišnih putova, izražena pomoću FEV1, stupnjevana je od najblažeg do najtežeg stupnja: stupanj 1. FEV1 >80%, stupanj 2. FEV1 50-80%, stupanj 3. FEV1 30-50% i stupanj 4. FEV1 <30%.

### 5.6.1. Rezultati povezanosti SNP-a rs5744174 s kliničkim parametrima ispitanika

Rezultati analize povezanosti rs5744174 sa kliničkim parametrima ispitanika pokazali su da je testirani polimorfni biljeg statistički značajno povezan sa težinom KOPB-a prema GOLD-u,  $P=0,0291$  (Tablica 12) i težinom opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1,  $P=0,049$  (Tablica 13). Također, rezultati ovih analiza pokazali su nepostojanje povezanosti testiranog polimorfizma sa stadijem karcinoma pluća,  $P=0,7467$  (Tablica 14).

**Tablica 12.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs5744174 i stadija KOPB-a prema GOLD klasifikaciji

GOLD	TLR5_rs5744174_TC			Suma redaka (RT)
	C/C	C/T	T/T	
A	18	63	33	114 (23,0%)
	15,8% RT	55,3% RT	28,9% RT	
	17,3% CT	26,9% CT	20,9% CT	
	3,6% GT	12,7% GT	6,7% GT	
B	41	102	64	207 (41,7%)
	19,8% RT	49,3% RT	30,9% RT	
	39,4% CT	43,6% CT	40,5% CT	
	8,3% GT	20,6% GT	12,9% GT	
C	17	39	35	91 (18,3%)
	18,7% RT	42,9% RT	38,5% RT	
	16,3% CT	16,7% CT	22,2% CT	
	3,4% GT	7,9% GT	7,1% GT	
D	28	30	26	84 (16,9%)
	33,3% RT	35,7% RT	31,0% RT	
	26,9% CT	12,8% CT	16,5% CT	
	5,6% GT	6,0% GT	5,2% GT	
Suma stupaca (CT)	104	234	158	496 (GT)
	21,00%	47,20%	31,90%	

Hi-kvadrat	14,044
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	<b>P = 0,0291</b>
Koeficijent kontingencije	0,166

**Tablica 13.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs5744174 i težine opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1

FEV1	TLR5_rs5744174_TC			Suma redaka (RT)
	C/C	C/T	T/T	
>80%	23	67	37	127 (19,3%)
	18,1% RT	52,8% RT	29,1% RT	
	17,2% CT	22,2% CT	16,7% CT	
	3,5% GT	10,2% GT	5,6% GT	
50-80%	57	145	102	304 (46,2%)
	18,8% RT	47,7% RT	33,6% RT	
	42,5% CT	48,0% CT	45,9% CT	
	8,7% GT	22,0% GT	15,5% GT	
30-50%	30	63	61	154 (23,4%)
	19,5% RT	40,9% RT	39,6% RT	
	22,4% CT	20,9% CT	27,5% CT	
	4,6% GT	9,6% GT	9,3% GT	
<30%	24	27	22	73 (11,1%)
	32,9% RT	37,0% RT	30,1% RT	
	17,9% CT	8,9% CT	9,9% CT	
	3,6% GT	4,1% GT	3,3% GT	
Suma stupaca (CT)	134	302	222	658 (GT)
	20,40%	45,90%	33,70%	

Hi-kvadrat	12,647
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	<b>P = 0,0490</b>
Koeficijent kontingencije	0,137

**Tablica 14.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs5744174 i stadija karcinoma pluća prema TNM klasifikaciji

STADIJ	TLR5_rs5744174 TC			Suma redaka (RT)
	C/C	C/T	T/T	
1	10	23	18	51 (24,9%)
	19,6% RT	45,1% RT	35,3% RT	
	28,6% CT	23,2% CT	25,4% CT	
	4,9% GT	11,2% GT	8,8% GT	
2	11	30	22	63 (30,7%)
	17,5% RT	47,6% RT	34,9% RT	
	31,4% CT	30,3% CT	31,0% CT	
	5,4% GT	14,6% GT	10,7% GT	
3	9	31	15	55 (26,8%)
	16,4% RT	56,4% RT	27,3% RT	
	25,7% CT	31,3% CT	21,1% CT	
	4,4% GT	15,1% GT	7,3% GT	
4	5	15	16	36 (17,6%)
	13,9% RT	41,7% RT	44,4% RT	
	14,3% CT	15,2% CT	22,5% CT	
	2,4% GT	7,3% GT	7,8% GT	
Suma stupaca (CT)	35	99	71	205 (GT)
	17,10%	48,30%	34,60%	

Hi-kvadrat	3,479
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	P = 0,7467
Koeficijent kontingencije	0,129

### 5.6.2. Rezultati povezanosti SNP-a rs725084 s kliničkim parametrima ispitanika

Rezultati analize povezanosti rs725084 sa kliničkim parametrima ispitanika pokazali su da je testirani polimorfni biljeg statistički značajno povezan sa težinom KOPB-a prema GOLD-u,  $P=0,0241$  (Tablica 15), no bez značajne razlike u težini opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1,  $P=0,0868$  (Tablica 16). Također, rezultati ovih analiza pokazali su nepostojanje povezanosti testiranog polimorfizma sa stadijem karcinoma pluća,  $P=0,3848$  (Tablica 17).

**Tablica 15.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs725084 i stadija KOPB-a prema GOLD klasifikaciji

GOLD	TLR5_rs725084_TC			Suma redaka (RT)
	C/C	C/T	T/T	
A	16	69	27	112 (22,9%)
	14,3% RT	61,6% RT	24,1% RT	
	15,2% CT	30,0% CT	17,4% CT	
	3,3% GT	14,1% GT	5,5% GT	
B	48	92	65	205 (41,8%)
	23,4% RT	44,9% RT	31,7% RT	
	45,7% CT	40,0% CT	41,9% CT	
	9,8% GT	18,8% GT	13,3% GT	
C	21	35	36	92 (18,8%)
	22,8% RT	38,0% RT	39,1% RT	
	20,0% CT	15,2% CT	23,2% CT	
	4,3% GT	7,1% GT	7,3% GT	
D	20	34	27	81 (16,5%)
	24,7% RT	42,0% RT	33,3% RT	
	19,0% CT	14,8% CT	17,4% CT	
	4,1% GT	6,9% GT	5,5% GT	
Suma stupaca (CT)	105	230	155	490 (GT)
	21,40%	46,90%	31,60%	

Hi-kvadrat	14,54
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	<b>P = 0,0241</b>
Koeficijent kontingencije	0,17

**Tablica 16.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs725084 i težine opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1

FEV1	TLR5_rs725084_TC			Suma redaka (RT)
	C/C	C/T	T/T	
>80%	21	74	31	126 (19,3%)
	16,7% RT	58,7% RT	24,6% RT	
	15,1% CT	24,4% CT	14,7% CT	
	3,2% GT	11,3% GT	4,7% GT	
50-80%	66	137	99	302 (46,2%)
	21,9% RT	45,4% RT	32,8% RT	
	47,5% CT	45,2% CT	46,9% CT	
	10,1% GT	21,0% GT	15,2% GT	
30-50%	34	64	57	155 (23,7%)
	21,9% RT	41,3% RT	36,8% RT	
	24,5% CT	21,1% CT	27,0% CT	
	5,2% GT	9,8% GT	8,7% GT	
<30%	18	28	24	70 (10,7%)
	25,7% RT	40,0% RT	34,3% RT	
	12,9% CT	9,2% CT	11,4% CT	
	2,8% GT	4,3% GT	3,7% GT	
Suma stupaca (CT)	139	303	211	653 (GT)
	21,30%	46,40%	32,30%	

Hi-kvadrat	11,05
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	P = 0,0868
Koeficijent kontingencije	0,129

**Tablica 17.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs725084 i stadija karcinoma pluća prema TNM klasifikaciji

STADIJ	TLR5_rs725084_TC			Suma redka (RT)
	C/C	C/T	T/T	
1	7	23	20	50 (25,1%)
	14,0% RT	46,0% RT	40,0% RT	
	20,6% CT	22,1% CT	32,8% CT	
	3,5% GT	11,6% GT	10,1% GT	
2	12	28	20	60 (30,2%)
	20,0% RT	46,7% RT	33,3% RT	
	35,3% CT	26,9% CT	32,8% CT	
	6,0% GT	14,1% GT	10,1% GT	
3	10	29	14	53 (26,6%)
	18,9% RT	54,7% RT	26,4% RT	
	29,4% CT	27,9% CT	23,0% CT	
	5,0% GT	14,6% GT	7,0% GT	
4	5	24	7	36 (18,1%)
	13,9% RT	66,7% RT	19,4% RT	
	14,7% CT	23,1% CT	11,5% CT	
	2,5% GT	12,1% GT	3,5% GT	
Suma stupaca (CT)	34	104	61	199 (GT)
	17,10%	52,30%	30,70%	

Hi-kvadrat	9,589
Stupanj slobode	9
Razina značajnosti	P = 0,3848
Koeficijent kontingencije	0,16

### 5.6.3. Rezultati povezanosti SNP-a rs2072493 s kliničkim parametrima ispitanika

Rezultati analize povezanosti rs2072493 sa kliničkim parametrima ispitanika pokazali su da testirani polimorfni biljeg nije statistički značajno povezan sa težinom KOPB-a prema GOLD-u,  $P=0,9818$  (Tablica 18), niti sa težinom opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1,  $P=0,7545$  (Tablica 19). Također, rezultati ovih analiza pokazali su nepostojanje povezanosti testiranog polimorfizma sa stadijem karcinoma pluća,  $P=0,4086$  (Tablica 20).

**Tablica 18.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs2072493 i stadija KOPB-a prema GOLD klasifikaciji

GOLD	TLR5_rs2072493_AG			Suma redaka (RT)
	A/A	G/A	G/G	
A	65	38	7	110 (22.4%)
	59,1% RT	34,5% RT	6,4% RT	
	23,2% CT	21,3% CT	21,9% CT	
	13,3% GT	7,8% GT	1,4% GT	
B	115	75	14	204 (41.6%)
	56,4% RT	36,8% RT	6,9% RT	
	41,1% CT	42,1% CT	43,7% CT	
	23,5% GT	15,3% GT	2,9% GT	
C	53	32	7	92 (18.8%)
	57,6% RT	34,8% RT	7,6% RT	
	18,9% CT	18,0% CT	21,9% CT	
	10,8% GT	6,5% GT	1,4% GT	
D	47	33	4	84 (17.1%)
	56,0% RT	39,3% RT	4,8% RT	
	16,8% CT	18,5% CT	12,5% CT	
	9,6% GT	6,7% GT	0,8% GT	
Suma stupaca (CT)	280	178	32	490 (GT)
	57,10%	36,30%	6,50%	

Hi-kvadrat	1,094
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	$P = 0,9818$
Koeficijent kontingencije	0,047

**Tablica 19.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs2072493 i težine opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1

FEV1	TLR5_rs2072493_AG			Suma redaka (RT)
	A/A	G/A	G/G	
>80%	80	37	7	124 (19,0%)
	64,5% RT	29,8% RT	5,6% RT	
	19,0% CT	18,8% CT	20,6% CT	
	12,3% GT	5,7% GT	1,1% GT	
50-80%	193	91	17	301 (46,2%)
	64,1% RT	30,2% RT	5,6% RT	
	45,8% CT	46,2% CT	50,0% CT	
	29,6% GT	14,0% GT	2,6% GT	
30-50%	102	43	9	154 (23,6%)
	66,2% RT	27,9% RT	5,8% RT	
	24,2% CT	21,8% CT	26,5% CT	
	15,6% GT	6,6% GT	1,4% GT	
<30%	46	26	1	73 (11,2%)
	63,0% RT	35,6% RT	1,4% RT	
	10,9% CT	13,2% CT	2,9% CT	
	7,1% GT	4,0% GT	0,2% GT	
Suma stupaca (CT)	421	197	34	652 (GT)
	64,60%	30,20%	5,20%	

Hi-kvadrat	3,42
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	P = 0.7545
Koeficijent kontingencije	0,072

**Tablica 20.** Povezanost između genotipova polimorfizma TLR5 rs2072493 i stadija karcinoma pluća prema TNM klasifikaciji

STADIJ	TLR5_rs2072493_AG			Suma redaka (RT)
	A/A	G/A	G/G	
1	28	19	4	51 (25,1%)
	54,9% RT	37,3% RT	7,8% RT	
	24,3% CT	25,7% CT	28,6% CT	
	13,8% GT	9,4% GT	2,0% GT	
2	35	23	3	61 (30,0%)
	57,4% RT	37,7% RT	4,9% RT	
	30,4% CT	31,1% CT	21,4% CT	
	17,2% GT	11,3% GT	1,5% GT	
3	26	24	5	55 (27,1%)
	47,3% RT	43,6% RT	9,1% RT	
	22,6% CT	32,4% CT	35,7% CT	
	12,8% GT	11,8% GT	2,5% GT	
4	26	8	2	36 (17,7%)
	72,2% RT	22,2% RT	5,6% RT	
	22,6% CT	10,8% CT	14,3% CT	
	12,8% GT	3,9% GT	1,0% GT	
Suma stupaca (CT)	115	74	14	203 (GT)
	56,70%	36,50%	6,90%	

Hi-kvadrat	6,132
Stupanj slobode	6
Razina značajnosti	P = 0,4086
Koeficijent kontingencije	0,171

## 6 RASPRAVA

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je posljedica dugotrajnog izlaganja dišnih puteva štetnim tvarima, posebno duhanskom dimu, što uzrokuje kroničnu upalu i uništavanje plućnog parenhima (145). Karakterizira je trajna upala dišnih putova, ozljeda pluća i prekomjerna smrt epitelnih stanica (146), dok je karcinom pluća (KP) uzrokovan nekontroliranim umnožavanjem epitelnih stanica. Zajednički čimbenik rizika nalazi se u izloženosti duhanskom dimu i pretpostavljenoj genetskoj predispoziciji koja je potkrijepljena učestalošću ovih bolesti u samo malog dijela pušača. Samo 15% pušača tijekom cijelog života razvija karcinom pluća, a 10% karcinoma pluća javlja se kod nepušača (147).

Među skupinama pacijenata uključenih u ovo istraživanje, onih sa izoliranim KOPB-om i onih sa KOPB-om i karcinomom pluća, prisutno je manje od 10% nepušača, a u skupini samo sa karcinomom pluća je značajno najviše nepušača u odnosu na ostale skupine (Tablica 1).

Ranije je utvrđeno da pušači sa dijagnosticiranim KOPB-om dva puta češće razvijaju karcinom pluća nego pušači bez KOPB-a, a karcinom pluća je najčešći uzrok smrti u KOPB-u (148). Među ispitanicima uključenim u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije medijan preživljenja kod KOPB-a bio je značajno veći u skupini koja je imala samo KOPB ( $P < 0,001$ ), dok je preživljenje između skupina sa karcinomom pluća bilo podjednako ( $P = 0,229$ ) (Tablica 4). Ranije studije također su pokazale da je karcinom pluća najčešći uzrok smrti u bolesnika s blagim do umjerenim KOPB-om (149).

KOPB i karcinom pluća rijetko su dijagnosticirane kao izolirane bolesti i komorbiditeti su često prisutni kod bolesnika sa KOPB-om i/ili karcinomom pluća. Neke bolesti pojavljuju se bez jasnog zajedničkog etiološkog čimbenika, dok druge dijele čimbenike rizika. Opće prihvaćeno mišljenje je da je zajednička podloga KOPB-a, karcinoma pluća i većina komorbiditeta kronična sistemna upala. Među ispitanicima uključenima u ovo istraživanje arterijska hipertenzija je bila najzastupljenija u skupini pacijenata sa izoliranim KOPB-om, i značajno češća u odnosu na skupinu pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća ( $P = 0,035$ ). Učestalost kardiovaskularnih bolesti je bila značajno veća u skupini pacijenata sa KOPB-om u odnosu na ostale dvije skupine ( $P < 0,001$ ). Čini se da je sistemska upala uočena kod KOPB-a ključna odrednica za razvoj



plućne i sistemske disfunkcije endotela koja povećava rizik od razvoja arterijske hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti (150). Također, prepoznata je povezanost upanih procesa u plućima i gastrointestinalnih poremećaja sa narušenom fiziološkom florom (mikrobiotom). Povratna komunikacija između crijevne mikrobiote i pluća, nazvan “os crijeva – pluća”, od vitalne je važnosti za imunološki odgovor i homeostazu u dišnim putovima (151). Gastrointestinalni komorbiditeti, u kojima je zasigurno ta os poremećena, bili su češći kod pacijenata sa KOPB-om u odnosu na skupinu sa karcinomom pluća ( $P=0,035$ ). Tuberkuloza je povezana sa razvojem kroničnih upalnih respiratornih bolesti, a prijašnjim istraživanjem dokazano je da bolesnici sa KOBP-om oboljeli od tuberkuloze koji su koristili inhalacijske kortikosteroide imaju povećan rizik za razvoj karcinoma pluća (152). U populaciji uključenoj u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije tuberkuloza je bila najčešća u skupini pacijenata sa izoliranim KOPB-om i značajno češća u odnosu na ostale dvije skupine (KOPB vs KOPB + karcinom pluća  $P<0,001$ ; KOPB vs karcinom pluća  $P=0,049$ ).

KOPB i karcinom pluća dijele mnoge rizične čimbenike, ali značajke KOBP-a koje mogu signalizirati sklonost razvoju karcinoma pluća nisu razjašnjene. Stavovi o tome je li rizik za razvoj karcinoma pluća proporcionalan težini opstrukcije ili je povezan sa najblažim stadijima, kontroverzni su. Dok su Mannino i sur. pokazali da je rizik proporcionalan težini opstrukcije dišnih putova (21), de Torres i suradnici pokazali su da su najblaži stadiji KOPB-a povezani s većim rizikom za razvoj karcinoma pluća (153). U populaciji uključenoj u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije u skupini pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća značajno češći su bili pripadnici GOLD stadija A i B u odnosu na skupinu samo sa KOPB-om ( $P<0,001$ ).

Ne tako davno objavljene prospektivne studije pokazale su da pušači sa KOPB-om (ili smanjenim forsirani ekspiratorni volumen u 1. sekundi (FEV1)) imaju od 4 do 6 puta povećan rizik za razvoj karcinoma pluća u usporedbi sa pušačima sa normalnom funkcijom pluća (21). U populaciji uključenoj u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije skupina pacijenata sa KOPB-om je imala značajno niže vrijednosti Tiffeneau indeksa (FEV1/FVC) i FEV1 u odnosu na skupine sa karcinomom pluća ( $P<0,001$ ). Doprinos genetskih čimbenika na odstupanja u FEV1 je mnogo veći od izloženosti pušenju. U populaciji uključenoj u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije pokazano je da postoji statistički značajna razlika među nositeljima određenog genotipa polimorfizma

TLR5 rs5744174 i težine KOPB-a definirane GOLD kriterijima ( $P=0,0291$ ), kao i težine opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1 ( $P=0,0490$ ) (Tablice 12 i 13). Također, značajna razlika je utvrđena i među nositeljima određenog genotipa polimorfizma TLR5 rs725084 i težine KOPB-a definirane GOLD kriterijima ( $P=0,0241$ ), no bez značajne razlike u težini opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1 ( $P=0,0868$ ) (Tablice 15 i 16). Kod kroničnih pušača, ograničenje protoka zraka (ili smanjen FEV1) je izrazito genetski određena reakcija na pušenje (154)(155). Inačice ovih gena postaju klinički očite (ili prodorne) tek nakon više desetljeća pušenja u klasičnoj interakciji gen-okoliš.

Uz FEV1 široko korišten test plućne funkcije u postavljanju dijagnoze KOPB-a je difuzni kapacitet pluća za ugljični monoksid (eng. DLCO, *Diffusing capacity for carbon monoxide*). Mjeri sposobnost plućnih alveolarnih i kapilarnih površina za izmjenu plinova. Neki pušači sa normalnom spirometrijom imaju nizak DLCO (156). Koeficijent nazvan COPD-LUCSS (eng. *COPD-Lung Cancer Screening Score*) je alat osmišljen kako bi pomogao identificirati bolesnike sa KOPB s najvećim rizikom za razvoj karcinoma pluća (157). Uključuje dob iznad 60 godina, indeks tjelesne mase manji od  $25 \text{ kg/m}^2$ , pack-year veći od 60 godina i prisutnost emfizema. Kapacitet difuzije ugljičnog monoksida smatra se surogatnim pokazateljem emfizema, i upotreba DLCO umjesto emfizema utvrđenog CT-om koristan je za identificiranje bolesnika sa KOPB-om sa povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća (158). U populaciji uključenoj u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije, skupina koja je imala samo KOPB imala je najveći udio značajnog pada kapaciteta difuzije ugljičnog monoksida (DLCO) u odnosu na ostale skupine ( $P<0,001$ ) (Tablica 2).

Prije gotovo jednog desetljeća dokazano je da pacijenti sa potvrđenom dijagnozom KOPB imaju 6 do 13 puta veći rizik od razvoja karcinoma pluća u usporedbi sa zdravom populacijom (159), a uloga KOPB-a u karcinomu pluća potkrijepljena je otkrićem da 40% do 70% bolesnika s karcinomom pluća ima klinički potvrđen KOPB koji se razvio prije karcinoma (153), a 20% do 30% bolesnika s KOPB-om umire od karcinoma pluća (160). Otkriven je širok spektar različitih čimbenika uključenih u tumorogenezu kod pacijenata sa KOPB-om, poput štetne aktivnosti duhanskog dima, mutacija, nedostatnih mehanizama za popravljanje DNK i oksidativnog stresa (161). Doprinos duhanskog dima genetskoj osjetljivosti na različite bolesti dokumentiran je već 20 godina, posebno za gene koji su uključeni u aktivaciju imunološkog odgovora, gdje su

utvrđeni genetski polimorfizmi (inačice citokroma P-450, N-acetiltransferaze i glutation S-transferaze) koji mogu modulirati rizik za razvoj karcinoma (162). Najveću izloženost duhanskom dimu u populaciji uključenoj u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije imali su pacijenti u skupini sa KOPB-om i karcinomom pluća te je medijan vrijednosti pack-year bio značajno veći u odnosu na ostale skupine ( $P=0,009$  i  $P=0,032$ ).

Opterećenje pluća štetnim česticama i oksidansima može potaknuti aktivaciju imunoloških stanica i posljedična oštećenja putem više mehanizama. Oksidativni stres regulira specifične puteve prijenosa signala koji su uključeni u upalne procese pluća (163). Ponavljajuća aktivacija epitela dišnih putova i cirkulirajućih imunoloških stanica štetnim česticama rezultira kroničnom upalom i nakupljanjem sluzi. Nakon aktiviranja epitelnih stanica i makrofaga štetnim česticama, ove stanice oslobađaju upalne citokine, poput IL-6, koji mobiliziraju neutrofile i makrofage (164). Zajedno s aktiviranim epitelom, sastojci duhanskog dima aktiviraju i povećavaju broja alveolarnih makrofaga, te dovode do povećanog lučenja sluzi i njenog neadekvatnog uklanjanja i podležeće upale koja uzrokuje ozljedu tkiva (165). TLR2, TLR4 i TLR9 već su povezani s upalom izazvanom duhanskim dimom. Karimi i sur. otkrili su prvi put da je TLR4 uključen u proizvodnju citokina potaknutu duhanskim dimom (166). Droemann i sur. dokazali su smanjenu TLR2 ekspresiju na makrofazima pušača i bolesnika sa KOPB-om (167). Mortaz i sur. pokazali su da dendritičke stanice i neutrofile nakon izlaganja duhanskom dimu izlučuju IL-8 putem aktivacije TLR9 (167).

Budući da 20-25% bolesnika sa KOPB-om nema pozitivnu pušačku anamnezu, drugi čimbenici, poput izloženosti profesionalnom zagađenju, prijašnjih respiratornih bolesti i drugih kroničnih bolesti, izmijenjenog nutritivnog statusa, alkoholizma, pretilosti, ograničene tjelesne aktivnosti, kao i starenja, važni su za poremećaj strukture pluća, funkcije i urođenog imuniteta kod nekih bolesnika sa KOPB-om (168). Također, sve je više dokaza o povezanosti između izgaranja biomasa i razvoja ili pogoršanja KOPB-a (169). U istraživanju u sklopu izrade ove disertacije skupina pacijenata sa KOPB-om imala je značajno mlađu dob pri dijagnozi u odnosu na ostale dvije skupine ( $P<0,001$  i  $P=0,005$ ). Indeks tjelesne mase (BMI) je bio značajno najniži u skupini pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća, u odnosu na ostale dvije skupine ( $P=0,006$  i  $P=0,015$ ) (Tablica 4).

Profesionalna izlaganja koja pogoršavaju plućne bolesti uključuju (ne)organsku prašinu iz usjeva i uzgoja životinja; kemikalije koje se ispuštaju u industrijskim proizvodima za kožu, hranu i gumu; metalne pare; i kamenu prašinu izvedenu iz ugljena, stijena, betona ili opeke (170). Čestice otpuštene iz hlapivih para goriva pojačavaju reakciju na kolonizirane mikroorganizme i mijenjaju prirodu upalnog okruženja izazvanog aktivacijom Toll-like receptora (171). Izloženost štetnim česticama na radnom mjestu nije pokazala značajnu razliku u raspodjeli među ispitanicima uključenih u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije (Tablica 2).

Smanjena funkcija TLR-a može uzrokovati pogoršanje bolesti zbog neadekvatnog prepoznavanja sastavnica patogena (172) kao i smanjene fagocitoze bakterija i apoptotskih stanica (173). S druge strane, prekomjerno aktiviranje TLR-a može rezultirati prekomjernom upalom i oštećenjem plućnog tkiva. Toll-like receptori djeluju kao senzori za prepoznavanje patogena, sudjeluju u pokretanju upalnih odgovora i igraju ključnu ulogu u regulaciji imunoloških stanica, preživljavanju i proliferaciji (174). Stoga se može pretpostaviti da upalne i neoplastične plućne bolesti povezane sa pušenjem mogu biti posredovane genetskim promjenama određenih TLR-a. Budući da TLR imaju važnu ulogu u urođenom imunološkom sustavu, prisutnost genotipskih promjena može dovesti do poremećaja regulacije TLR-a i narušavanju funkcija urođenog imunološkog sustava, što može uzrokovati nastanak različitih upalnih i malignih bolesti (103).

Nepravilan imunološki odgovor na udahnute štetne tvari (duhanski dim, zagađivači iz okoliša) obuhvaća neispravne mehanizme čišćenja i prezentaciju antigena. Ponavljajuća aktivacija epitela dišnih puteva i cirkulirajućih imunoloških stanica štetnim česticama rezultira kroničnom upalom. Dišni putevi više od četiri petine pacijenata uključenih u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije bili su izloženi štetnim tvarima iz duhanskog dima, a oko petine njih bilo je izloženo štetnim tvarima na radnom mjestu (Tablica 1 i Tablica 2).

Višestruki obrambeni mehanizmi, poput onih koje pruža epitelna barijera dišnih puteva i urođene imunološke stanice, uključujući alveolarne makrofage, neutrofile, dendritičke stanice i prirodne stanice ubojice, oslabljeni su u prisutnosti KOPB-a. Kao posljedica neispravne urođene imunološke obrane, pluća pušača sa KOPB-om često su kolonizirana patogenima koji uzrokuju sekundarnu upalu, glavni pokretač napredovanja bolesti (175). Pušenje dovodi do dramatičnih promjena u strukturi epitela dišnih puteva.

Među tim promjenama su pločasta metaplazija, zamjena cilijarnih i žljezdanih stanica pločastim stanicama koje nisu prisutne u normalnim dišnim putevima, te hiperplazija sluznice, što dovodi do opstrukcije dišnih puteva zbog pojačanog izlučivanja sluzi u njihov lumen (176).

Incidencija infekcija i rizik od karcinoma pluća povećana je u bolesnika s KOBP-om, što upućuje na postojanje promijenjenog imunološkog odgovora koji može ugroziti urođene zaštitne mehanizme za čimbenike okoliša i maligne bolesti. Zajednički patogenetski putevi mogu biti temelj osjetljivosti na ove dvije bolesti povezane sa pušenjem. Geni i signalni putevi djeluju zajedno s upalnim proteinima i njihovim receptorima u promicanju karcinogeneze. Cijelogenomske asocijacijske studije o karcinomu pluća, plućnoj funkciji i KOPB-u identificirale su brojne preklapajuće predispozicijske lokuse koji obuhvaćaju gene koji su u osnovi upalnih i apoptotičkih procesa posredovanih respiratornim epitelom i povezuju KOPB s karcinomom pluća na molekularno-genetskoj razini.

Istraživanjem u sklopu izrade ove disertacije analizirana je povezanost genetskih varijanti u genima koji kodiraju za TLR sa rizikom od razvoja karcinoma pluća u prisutnosti KOPB-a.

Dosadašnjim genetičkim mapiranjem otkriveno je nekoliko SNP-ova u osnovi KOBP-a i karcinoma pluća, od kojih većina pripada različitim genetskim obiteljima, poput enzima za razgradnju proteina i upalnih citokina (177). Uz one smještene na genima koji na proteinskom nivou dovode do zamjene aminokiselina, SNP-ovi koji su uključeni u prepisivanje gena također mogu izmijeniti funkciju proteina i dovesti do razvoja KOBP-a i karcinoma pluća (178). Polimorfizmi gena koji kodiraju TLR-e mogu igrati ulogu u etiologiji i patogenezi mnogih zloćudnih bolesti. Ova se povezanost temelji na poremećenom imunološkom odgovoru i povećanoj proizvodnji proupalnih citokina zbog određenih promjena u TLR signalnom putu, koji potiču razvoj infekcije i ozljedu tkiva (103).

Istraživanjem u sklopu izrade ove disertacije pronađeni su dokazi o povezanosti nekoliko SNP-ova u TLR genima i različitoj sklonosti bolesnika sa KOBP-om da razviju karcinom pluća. Prema rezultatima postoji korelacija između specifičnih genotipova polimorfizama TLR1 rs5743611, TLR5 rs2072493, TLR5 rs725084 i TLR9 rs352139 i rizika od razvoja karcinoma pluća (Tablice 6-11).

SNP-ovi smješteni u genima koji kodiraju za TLR mogu utjecati na sposobnost receptora da vežu patogene, dovesti do nedostataka u unutarstaničnom prijenosu ili rezultirati promijenjenim međudjelovanjem s adaptornim proteinima (106). U istraživanju u sklopu izrade ove disertacije pokazano je da su genotipovi TLR1 rs5743611 i TLR5 rs2072493 granično povezani sa razvojem karcinoma pluća u bolesnika sa KOPB-om, dok je genotip TLR9 rs352139 granično povezan sa zaštitnom funkcijom u razvoju karcinoma pluća kod istih (Tablica 7). Za TLR1 rs5743611 i TLR5 rs2072493 otkriveno je da je prisutnost minornog alela povezana s povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća (rs5743611 C/G + C/C OR=1,55 [1,05-2,28] P=0,030; rs2072493 G/G OR=2,82 [1,34-5,94] P=0,010). Za TLR9 pronađena je granična povezanost heterozigotnosti rs352139 sa zaštitnim učinkom na nastanak karcinoma pluća (A/G OR = 0,68 [0,46-1,00] P=0,050) (Tablica 7). Analizom odabranih SNP-ova, povezanih sa definiranim skupinama pacijenata u prvom krugu testa, na povećanom broju uzoraka, kontroliranom na dob i spol pacijenata otkriveno je da je minorni alel SNP-a TLR5 rs2072493 značajno povezan sa razvojem karcinoma pluća (G/A + G/G OR =1,71 [1,20- 2,43] P=0,003) (Tablica 9).

Alelne varijacije u genima koji sudjeluju u urođenom imunološkom odgovoru mogu objasniti individualne razlike u odgovorima na odgovarajuće nokse (47), a mikrookolišni uvjeti mogu utjecati na staničnu ekspresiju. Kronična upala, kao posljedica poremećenog imunološkog odgovora, dovodi do promjena u mikrookolišu pluća, koje pogoduju plućnoj karcinogenezi (121). Kronična upala ustanovljena je kao jedan od glavnih čimbenika koji su uključeni u širenje matičnih stanica karcinoma i napredovanje tumora (179). Toll-like receptori izraženi na imunološkim i plućnim epitelnim stanicama, igraju ključnu ulogu u razvoju upale pokretanjem signalnog puta, koji u konačnici vodi do oslobađanja transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B je aktiviran upalnim medijatorima i oksidativnim stresom i može predstavljati poveznicu između upale i karcinoma pluća. Matične stanice karcinoma pokazuju veću aktivaciju NF- $\kappa$ B TLR signalnog puta, što povećava sposobnost samoobnove i stvaranja morfoloških i funkcionalnih razlika u stanicama karcinoma (180). TLR-i, kao senzori na stanicama karcinoma pluća, mogu pogodovati staničnom rastu i invazivnim sposobnostima stanica karcinoma pluća i regulirati njihovo ponašanje.

Neograničeni kapacitet umnožavanja stanica i sprečavanje njihove smrti su obilježja stanica karcinoma, a TLR-ovi mogu pospješiti rast stanica karcinoma pluća putem proliferativnih ili anti-apoptotičkih signala. Prethodne studije pokazale su da su TLR4, 5, 7, 8 i 9 značajnije izraženi u nesitnostaničnom karcinomu pluća nego u normalnom plućnom tkivu (181). Aktivacija TLR4 može prouzrokovati neosjetljivost stanica karcinoma pluća na apoptozu potaknutu putem tumor-nekrotizirajućeg faktora (TNF) - $\alpha$  ili srodnih vezujućih molekula i izazvati apoptozu posredovanu signalnim putem NF- $\kappa$ B (182). Aktivacija TLR7 ili TLR8 u stanicama karcinoma pluća rezultira pokretanjem signalnog puta NF- $\kappa$ B i povećanjem stvaranja antiapoptotskih proteina, što je povezano s povećanim preživljavanjem stanica i otpornošću na staničnu smrt (127). Zhou i suradnici pokazali su da inhibicija TLR5 / MyD88 / NF- $\kappa$ B signalizacije potiče rast tumora u mišjim stanicama karcinoma pluća, dok ga aktiviranje tog signalnog puta inhibira (183). Stoga, intenziviranjem putova preživljavanja i stišavanjem apoptotskih putova posredovanih TLR-om moguće je pogodovati rastu stanica karcinoma pluća.

U istraživanju u sklopu izrade ove disertacije otkriveno je da je polimorfizam TLR5 rs2072493 statistički značajno povezan sa rizikom za razvoj karcinoma pluća u skupini pacijenata sa KOPB-om. Učestalost minornog alela TLR5 rs2072493 bila je statistički značajno povezana sa karcinomom pluća kada su podaci logističke regresije prilagođeni dobi i spolu (G/A + G/G OR=1,76 [1,26-2,46] P<0,001; G/G OR = 4,37 [2,03-9,45] P<0,001) (Tablica 10). Kada su uspoređene raspodjele genotipa odabranih SNP-ova između skupine bolesnika sa KOBP-om i karcinomom pluća i skupine bolesnika sa izoliranim karcinomom pluća, uočena je statistički značajna povezanost SNP-a TLR5\_rs725084 gdje varijanta C/C povećava rizik za razvoj karcinoma pluća (OR=1,84 [1,06- 3,19] P=0,030) (Tablica 11).

Općenito TLR-i su lokalizirani ili na vanjskoj membrani stanice ili na membrani endoplazmatskog retikuluma, pa tako i u tumorskim stanicama pluća. Prijenos signala putem TLR-a pokreće stvaranje proupalnih proteina koji mogu stimulirati nastanak tumora. Stoga se pretpostavlja da je reguliranjem ekspresije i signalizacije ovih gena moguće povećati ili smanjiti sklonost bolesnika sa KOPB-om za razvoj karcinoma pluća. Polimorfizmi u TLR-ima povezani su sa nastankom karcinoma kod ljudi, što ukazuje na potencijalnu ulogu TLR-a u karcinogenezi u plućima (184). Ova se veza temelji na slabljenju imunološkog odgovora na bakterijske ili virusne čestice koji potiču

produkciju proupalnih citokina određenim molekularnim promjenama u TLR putovima (103). Pretjerana aktivacija TLR-a može rezultirati nekontroliranim upalnim procesima i posljedičnim oštećenjem plućnog tkiva. S druge strane, smanjena ekspresija i funkcija TLR-a mogu dovesti do imunosupresivnog stanja. Smatra se da TLR-i imaju ulogu u regulaciji mikrookoliša tumora usklađivanjem pro- i antitumorigenih signala. Upalna i hipoksična priroda mikrookoliša tumora razaranjem stanica stvara molekule (DAMP-ove), koje se vežu na TLR-e imunoloških i tumorskih stanica i usmjeravaju njihove signalne puteve prema kroničnom štetnom stanju i oštećenju obrane pluća (185). Štetne tvari iz duhanskog dima također dovode do oštećenja urođene obrane pluća i uzrokuju povećano nakupljanje štetnih tvari, što stvara začarani krug i održava procese oštećenja (186). Populaciju uključenu u istraživanje u sklopu izrade ove disertacije uglavnom su činili pušači i njihov urođeni imunološki sustav mogao bi se smatrati neadekvatnim.

Krajnja točka TLR signalnog puta je aktivacija transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B, koji regulira transkripciju mnogih gena koji kodiraju proteine imunološkog odgovora i upale (187). Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B aktivira se pomoću upalnih medijatora i oksidativnog stresa i može predstavljati molekularnu vezu između upale i karcinoma pluća jer je aktiviran u epitelu bronha i u upalnim stanicama u donjim dišnim putovima bolesnika s KOPB-om, i u premalignim lezijama bronhalnog epitela i neoplastičnim stanicama karcinoma pluća (188). Pojačana aktivacija NF- $\kappa$ B rezultira upalom u plućima i znatnim protumorigenim učinkom. Populacija izvršnih stanica koja posreduje napredovanje i metastatsko širenje tumora su makrofagi, koji se mobiliziraju u pluća zbog aktivacije NF- $\kappa$ B u epitelnim stanicama (189). Povećana zastupljenost M2 makrofaga koju potiču citokini kao što je IL-6 u samom tumorskom mikrookolišu, govori u prilog da je polarizacija makrofaga uočena u bolesnika s KOPB-om protumorigena (190).

U istraživanju u sklopu izrade ove disertacije analizirana je povezanost genotipova polimorfizma rs2072493, za koji je utvrđeno da je statistički značajno povezan sa rizikom za razvoj karcinoma pluća u prisutnosti KOPB-a, s koncentracijom proinflammatornog citokina interleukina 6 (IL-6) u serumima ispitanika. Dokazano je da bolesnici sa KOPB-om koji nose genotip minornog alela TLR5 rs2072493 (G/G + A/G) pokazuju smanjenu koncentraciju IL-6 u serumu (P=0,026) (Slika 9) i osjetljiviji su na razvoj karcinoma pluća (G/A + G/G OR=1,76 [1,26-2,46] P<0,001) (Tablica 10). IL-6 je pluripotentni citokin koji ima važnu ulogu u imunološkoj obrani i onkogenezi (191), te njegova deregulirana



ekspresija značajno pridonosi patogenezi upalnih, autoimunih i malignih bolesti (133). IL-6 je glikoprotein koji je izvorno identificiran kao regulator diferencijacije limfocita B, ali je kasnije pokazano da ga može sintetizirati veliki broj različitih stanica, uključujući monocite, makrofage, limfocite, fibroblaste, keratinocite, endotelne stanice i neke tumore stanice (192). Za IL-6 je izvještavano o njegovom sudjelovanju u tumorogenezi povezanoj sa upalom. Dokazano je da igra važnu ulogu u diferencijaciji mijeloidnih supresorskih stanica (eng. MDSCs, *myeloid-derived suppressor cells*), što može biti važno za upalne procese unutar samog tumora (193). Teorija da stanice karcinoma stvaraju upalni mikrookoliš koji potiče njihovo razmnožavanje argumentirana je istraživanjem Kim i suradnika u kojem su pokazali da su stanice karcinoma pluća značajni aktivatori makrofaga koji dovode do stvaranja IL-6 pokretanjem signalnog puta preko aktivacije Toll-like receptora 2 i 6 (194). IL-6 pokreće pro-tumorsku makrofagnu M2 polarizaciju, što sugerira da je jedan od mehanizama blokade aktivacije IL-6, kojim se suzbija progresiju tumora, reprogramiranje tumorskog mikrookoliša (136).

Interleukin IL-6 važan je regulator imunološkog odgovora i upale, a proizvode ga limfociti T i B, fagocitne stanice, endotelne stanice i mnoge druge stanice. Proizvodnja IL-6 regulirana je transkripcijskim faktorom NF- $\kappa$ B. Upala povezana sa NF- $\kappa$ B aktivacijom i IL-6 signalizacijom, koja potiče razvoj tumora, prilagođava njegov mikrookoliš prema supresivnom stanju što se smatra ključnim korakom za tumorogenezu (30). Spontana proizvodnja IL-6 uočena je kod različitih tumora i uključena je u razvoj i napredovanje karcinoma, te otpornost na lijekove koji se koriste u liječenju karcinoma (121).

SNP-ovi u genu IL-6 povezani su sa napredovanjem nekoliko bolesti. Za SNP rs1800796 (-634 C/G) dokazana je značajna povezanost sa razvojem karcinoma pluća kod bolesnika homozigotnih za C/C u usporedbi sa G/G homozigotima ili G/C heterozigotima u azijskoj populaciji (195). Od tri SNP-a rs1800797 (-597 G/A), rs1800795 (-174 G/C) i rs1800796 (-572 G/C) otkrivenih u promotorskom području IL-6, nađeno je da su -597 /G i -7272 /C povezani sa razvojem KOPB-a u španjolskoj populaciji (196).

Rezultati istraživanja u sklopu izrade ove disertacije otkrili su da su genotipovi minornih alela gena TLR5 (G/G + A/G) polimorfizma rs2072493 statistički značajno povezani sa smanjenom koncentracijom IL-6 u serumu te da su bolesnici sa KOPB-om

koji sadrže genotip minornog alela TLR5 rs2072493 osjetljiviji na razvoj karcinoma pluća. Rezultati ovog istraživanja daju naznaku o povezanosti genetičke varijabilnosti mehanizama nadzora urođene imunosti i upale sa doprinosom razvoju karcinoma pluća kod osoba koje imaju dijagnosticiran KOPB. Budući da kronična upala ne uzrokuje uvijek bolest, potrebni su dodatni genetski i okolišni čimbenici. Otkriveno je nekoliko SNP-ova koji su uključeni u KOPB i patogenezu karcinoma.

Ovo istraživanje također je pokazalo da postoji korelacija i između genotipa C/G polimorfizma TLR1 rs5743611 i povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća, neovisno o statusu KOPB-a, dok genotip G/G polimorfizma TLR5 rs2072493 i genotip C/C polimorfizma TLR5 rs725084 predstavljaju čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća u bolesnika sa KOPB-om. Ti rezultati podupiru koncept da karcinom pluća nije samo složena genetska bolest koja nastaje kao posljedica izloženosti pušenju kod genetski osjetljivih ljudi, već je to ujedno i bolest mješovitog fenotipa koja uključuje spirometrijski definiran KOPB kao podfenotip. Očito je dakle da postoje predisponirajući genetski lokusi koji imaju preklapajući učinak na razvoj KOPB-a i karcinoma pluća i moguće je da su specifični genetski čimbenici povezani sa KOPB-om jednako važni i za razvoj karcinoma pluća. Prema rezultatima ovog istraživanja, čini se da bi se među tim genetskim predisponirajućim čimbenicima s preklapajućim učinkom vrlo vjerojatno mogli naći i SNP-ovi koji kodiraju TLR-ove i njihovi proteini. TLR1 rs5743611 i TLR5 rs725084 , a posebno TLR5 rs2072493 bi možda mogli predstavljati novu, u literaturi još neopisanu, imunološku vezu između karcinoma pluća i KOPB-a koja bi mogla dovesti do poboljšanog predviđanja rizika za razvoj bolesti, boljeg razumijevanja mehanizama nastanka bolesti i razvoja novih strategija u liječenju ovih teških bolesti.

## 7 ZAKLJUČAK

- Ovim istraživanjem otkriveni su specifični genski lokusi TLR1 rs5743611 i TLR5 rs725084, a posebno TLR5 rs2072493, koji mogu postaviti imunološku vezu između karcinoma pluća i KOBP-a. Predstavlja inovativan pristup razumijevanju mehanizama bolesti koji bi mogao dovesti do poboljšanog predviđanja rizika i otkrivanja podtipova bolesti. Na temelju ovih rezultata mogle bi se razviti nove metode specifičnog i racionalnog liječenja, te bi otkriveni polimorfizmi trebali biti uzeti u obzir za daljnja onkološka istraživanja.
- Rezultati istraživanja potvrdili su utjecaj polimorfizama jednog nukleotida gena za TLR-e na pojavnost kronične opstruktivne plućne bolesti i karcinoma pluća. Postoji korelacija između C/G genotipa TLR1 rs5743611 i povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća, dok G/G genotip polimorfizma TLR5 rs2072493 i C/C genotip polimorfizma TLR5 rs725084 predstavljaju čimbenik rizika za razvoj karcinoma pluća u bolesnika sa KOBP-om. Za TLR9 pronađena je granična povezanost heterozigotnosti rs352139 (A/G) sa protektivnim učinkom na nastanak karcinoma pluća.
- Rezultati analize utjecaja prisutnosti polimorfizma TLR5 rs2072493, za koji je utvrđeno da je povezan sa rizikom za razvoj karcinoma pluća u prisutnosti KOBP-a, na koncentraciju IL-6 pokazali su da bolesnici sa KOPB-om koji nose genotip minornog alela TLR5 rs2072493 (G/G + A/G) pokazuju smanjenu koncentraciju IL-6 u serumu ( $P=0,026$ ) i osjetljiviji su na razvoj karcinoma pluća (G/A + G/G OR=1,76 [1,26-2,46]  $P<0,001$ ).
- Postoji statistički značajna razlika među nositeljima genotipa polimorfizma TLR5 rs5744174 i težine KOPB-a definirane GOLD kriterijima ( $P=0,0291$ ), kao i među nositeljima genotipa polimorfizma TLR5 rs725084 ( $P=0,0241$ ). Polimorfni biljeg rs5744174 također je statistički značajno povezan sa težinom opstrukcije dišnih puteva definirane sa FEV1 ( $P=0,049$ ).
- Rezultati analize općih karakteristika ispitanika pokazali su da u skupini pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća (KP) značajno češći pripadnici GOLD stadija A i B u odnosu na skupinu samo sa KOPB-om ( $P<0,001$ ). U skupini samo sa karcinomom pluća je značajno najviše nepušača u odnosu na

- ostale skupine (KOPB vs KOPB+KP  $P=0,005$ ; KOPB vs KP  $P<0,001$ ; KOPB+KP vs KP  $P=0,019$ ). Skupina sa KOPB-om ima značajno nižu smrtnost u odnosu na skupinu pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća ( $P<0,001$ ).
- Od komorbiditeta arterijska hipertenzija je najzastupljenija u skupini s KOPB-om, i značajno češća u odnosu na skupinu pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća ( $P=0,035$ ). Učestalost kardiovaskularnih bolesti je značajno veća u skupini pacijenata sa KOPB-om u odnosu na ostale dvije skupine ( $P<0,001$ ), dok su gastrointestinalni komorbiditeti češći samo u odnosu na skupinu sa karcinomom pluća ( $P=0,035$ ). Tuberkuloza je najčešća u skupini samo s KOPB-om i značajno češća u odnosu na ostale dvije skupine (KOPB vs KOPB+KP  $P<0,001$ ; KOPB vs KP  $P=0,049$ ). Mentalne bolesti i poremećaji su značajno češći u skupini pacijenata sa KOPB-om u odnosu na skupinu samo sa karcinomom pluća ( $P=0,006$ ).
  - Udio adenokarcinoma značajno je veći u skupini samo sa karcinomom pluća ( $P<0,001$ ), dok je karcinom pločastih stanica češći u skupini koja je imala i KOPB ( $P<0,001$ ). Stadij 4 karcinoma pluća značajno je zastupljeniji u skupini samo sa karcinomom pluća ( $P=0,027$ ).
  - Skupina pacijenata sa KOPB-om ima značajno mlađu dob pri dijagnozi u odnosu na na ostale dvije skupine ( $P<0,001$  i  $P=0,005$ ). Indeks tjelesne mase najniži je u skupini pacijenata sa KOPB-om i karcinomom pluća, u odnosu na ostale dvije skupine ( $P=0,006$  i  $P=0,015$ ). Najveću ekspoziciju duhanskom dimu imali su pacijenti u skupini sa KOPB-om i karcinomom pluća te je medijan vrijednosti pack-year bio značajno veći u odnosu na ostale skupine ( $P=0,009$  i  $P=0,032$ ). Također, skupina s KOPB-om je imala značajno niže vrijednosti FEV1 u odnosu na skupine sa karcinomom pluća ( $P<0,001$ ).

## 8 SAŽETAK

Kronična upala povezana je sa nastankom karcinoma, a Toll-like receptori (TLR) ključni su sudionici u regulaciji upalnog odgovora. Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) se smatra najvećim neovisnim čimbenikom rizika za nastanak karcinoma pluća (KP), što ukazuje da u razvoju obje bolesti postoji preklapajuća genetska podloga. Obzirom na važnu ulogu TLR-a u aktivaciji i regulaciji imunološkog odgovora, u ovom istraživanju pretpostavljeno je da bi njihova genetička varijabilnost mogla biti povezana s razvojem KOPB-a i karcinoma pluća. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da poremećeni procesi regulacije upale, u kontekstu smanjene aktivnosti TLR-a, doprinose razvoju karcinoma pluća kod pacijenata s dijagnosticiranim KOPB-om. U istraživanje je bilo uključeno 940 pacijenata, podijeljenih u tri skupine: KOBP vs KOPB + KP, KOPB vs KP, KOPB + KP vs KP. Obuhvaćeno je 13 polimorfizama jednog nukleotida (SNP-ova) smještenih u 6 različitih gena koji kodiraju za TLR-e. Genetska povezanost procijenjena je logističkom regresijom, te je prilagođena dobi i spolu. Razina IL-6 u serumu određena je ELISA-om. Rezultati su pokazali povezanost između C/G genotipa TLR1 rs5743611 i povećanog rizika za razvoj karcinoma pluća, dok su genotipovi polimorfizama TLR5 G/G (rs2072493) i C/C (rs725084) povezani s razvojem karcinoma pluća u bolesnika sa KOBP-om. Nakon prilagodbe na dob i spol, pokazano je da je polimorfizam rs2072493 statistički značajno povezan s rizikom za razvoj karcinoma pluća u prisutnosti KOBP-a. Također, polimorfizam rs2072493 povezan je sa statistički značajnim smanjenjem koncentracije IL-6 u serumu ispitanika. Rezultati ovog istraživanja mogli bi pridonijeti razumijevanju povezanosti promijenjenog imunološkog odgovora i veze između karcinoma pluća i KOBP-a. Također, ovi bi rezultati možda mogli predstavljati u literaturi još neopisanu, novu povezanost između karcinoma pluća i KOBP-a u kontekstu promijenjenog imunološkog odgovora, a koja bi mogla omogućiti predviđanje rizika za razvoj bolesti, bolje razumijevanje mehanizama nastanka bolesti i razvoj novih strategija u liječenju ovih teških bolesti.

## 9 SUMMARY

Genetic background of innate immunity in COPD and lung cancer

Irena Sokolović, 2021.

Chronic inflammation is associated with cancer development, and Toll-like receptors (TLRs) are key participants in the regulation of the inflammatory response. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is considered to be the largest independent risk factor for lung cancer (LC), indicating there is an overlapping genetic background in the development of both diseases. Given the important role of TLRs in the activation and regulation of the immune response, it was hypothesized in this study that their genetic variability could be associated with the development of COPD and lung cancer. The results of this study show that impaired inflammatory regulation processes, in the context of decreased TLR activity, contribute to the development of lung cancer in patients diagnosed with COPD. The study included 940 patients, divided into three groups: COPD vs COPD + KP, COPD vs KP, COPD + KP vs KP. It included 13 polymorphisms of one nucleotide (SNP) located in 6 different genes encoding TLRs. Genetic associations were estimated using logistic regression and adjusted for age and gender. Serum IL-6 levels were determined by ELISA. The results showed an association between C/G genotype TLR1 rs5743611 and an increased risk of developing lung cancer, while G/G genotype of TLR5 rs2072493 and C/C genotype of TLR5 rs725084 polymorphism were associated with the development of lung cancer in patients with COPD. After age and gender adjustment, the TLR5 rs2072493 polymorphism showed statistically significant association with risk of lung cancer development in the presence of COPD. Also, the rs2072493 polymorphism was associated with a statistically significant decrease in the serum IL-6 concentration. The results of this study could contribute to an understanding of the association between altered immune response and the link between lung cancer and COPD. Also, these results might represent an as yet undescribed, new association between lung cancer and COPD in the context of altered immune response, which could also allow risk prediction, better understanding of disease mechanisms and development of new strategies in the treatment of these serious diseases.

## 10 LITERATURA

1. Young R, Hopkins R, Etzel C E-ZR. Genetics of lung cancer susceptibility and COPD. *Lancet Oncol.* 2011;12(7):622–3.
2. Cohen BH, Graves CG, Levy DA, Diamond EL, Kreiss P, Menkes HA, et al. A common familial component in lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 1977;2(8037):523–6.
3. GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med.* 2017;5(9):691–706.
4. Quaderi SA, Hurst JR. The unmet global burden of COPD. *Glob Heal Epidemiol Genom.* 2018;3:82–4.
5. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis , Management , and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report : GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(5):557–82.
6. Manian P. Chronic obstructive pulmonary disease classification , phenotypes and risk assessment. *J Thorac Dis.* 2019;11(14):1761–6.
7. Sekine Y, Katsura H, Koh E, Hiroshima K, Fujisawa T. Early detection of COPD is important for lung cancer surveillance. *Eur Respir J.* 2012;39(5):1230–40.
8. Didkowska J, Wojciechowska U, Ma M, Łobaszewski J. Lung cancer epidemiology : contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med.* 2016;4(8):1–11.
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;0(0):1–41.
10. ECIS - European Cancer Information System. Estimates of cancer incidence and mortality in 2020 , for all countries. [Internet] [Internet]. 2021;20–3. Available from: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>
11. Inamura K. Lung Cancer : Understanding its Molecular Pathology and the 2015

- WHO Classification. *Front Oncol.* 2017;7(8):1–7.
12. Jackson. A. The Dominant Malignancy: Lung Cancer. *Nature.com Blogs* [Internet] [Internet]. 2021;9–12. Available from: <http://blogs.nature.com/ofschemesandmemes/2014/09/11/the-dominant-malignancy-lung-cancer>
  13. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin NA.* 2016;25(3):447–68.
  14. Travis WD. Lung Cancer Pathology Current Concepts. *Clin Chest Med.* 2020;41(1):67–85.
  15. Samaržija M et al. Smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka pluća nemalih stanica. *Liječ Vjesn.* 2017;11–12(139):365–71.
  16. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243–60.
  17. Denise Riedel Lewis , David P Check, Neil E Caporaso, William D Travis SSD. U.S. Lung Cancer Trends by Histologic Type. *Cancer.* 2014;120(18):2883–92.
  18. Tudor RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2749–55.
  19. Stratton MR. Exploring the Genomes of Cancer Cells : Progress and Promise. *Science.* 2011;331(6024):1553–8.
  20. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer : a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer.* 2004;2:3–9.
  21. Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, Redd SC. Low Lung Function and Incident Lung Cancer in the United States. *Arch Intern Med.* 2003;163(12):1475–80.
  22. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2011;378(9795):1015–26.
  23. Young ROP, Hopkins RAJ. How the genetics of lung cancer may overlap with COPD. *Respirology.* 2011;16(7):1047–55.
  24. Kahraman H, Orhan FO, Sucakli MH, Ozer A, Koksak N, Sen B. Temperament and character profiles of male COPD patients. *J Thorac Dis.* 2013;5(4):406–13.
  25. Houghton AM. Common Mechanisms Linking Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(4):273–7.



26. Skillrud DM, Offord KP MR. Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med.* 1986;105(4):503–7.
27. Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. Cilia Dysfunction in Lung Disease. *Annu Rev Physiol.* 2015;77(646):379–406.
28. Voynow JA, Gendler SJ, Rose MC. Regulation of Mucin Genes in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006;34(6):661–5.
29. Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, et al. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. 2007;117(11):19–21.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
31. Brantly M, Nukiwa T, Crystal RG. Molecular Basis of Alpha-1 -Antitrypsin Deficiency. *Am J Med* 1988 Jun 24;84(6A)13-31. 1988;84(6A):13–31.
32. Harris CC, Primack A CM. Elevated alpha1-Antitrypsin serum levels in lung cancer patients. *Cancer.* 1974;34(2):280–1.
33. Yang P, Sun Z, Krowka MJ, Aubry M, Bamlet WR, Wampfler JA, et al. Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. *Arch Intern Med.* 2008;168(10):1097–103.
34. Petrache I, Fijalkowska I, Zhen L, Medler TR, Brown E, Cruz P, et al. A Novel Antiapoptotic Role for alpha 1 -Antitrypsin in the Prevention of Pulmonary Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(11):1222–8.
35. Young RP, Hopkins RJ, Whittington CF, Hay BA, Epton MJ, Gamble GD. Individual and Cumulative Effects of GWAS Susceptibility Loci in Lung Cancer : Associations after Sub-Phenotyping for COPD. *PLoS One.* 2011;6(2):24–8.
36. Schwartz AG RJ. Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(1):16–22.
37. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;(2):197–216.
38. Garcia KC, Cooper M, Miller J. BenchMarks Dual Arms of Adaptive Immunity :

- Division of Labor and Collaboration between B and T Cells. *Cell*. 2019;179(1):3–7.
39. Swain SL. T-Cell Subsets: Who does the polarizing? *Curr Biol*. 1995;5(8):849–51.
  40. Murray P et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14–20.
  41. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-barel Y, Connor TPO, Crystal RG. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2009;183(4):2867–83.
  42. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):S3-23.
  43. Smole U, Kratzer B. Soluble pattern recognition molecules : Guardians and regulators of homeostasis at airway mucosal surfaces. *Eur J Immunol*. 2020;50(5):624–42.
  44. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805–20.
  45. Ranjan P, Bowzard JB, Schwerzmann JW, Jeisy-scott V, Fujita T, Sambhara S. Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol Med*. 2009;15(8):359–68.
  46. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009;113(7):1399–407.
  47. Hallman M, RÄmet M, Ezekowitz RA. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res*. 2001;50(3):315–21.
  48. Rosin DL, Okusa MD. Dangers Within : DAMP Responses to Damage and Cell Death in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(3):416–25.
  49. Janeway CA. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54(1):1–13.
  50. Bhattacharya J, Westphalen K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. *Semin Immunopathol*. 2017;38(4):461–9.
  51. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages : Their role , activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology*. 2018;223(4–5):383–96.
  52. Hartl D, Laval J, Greene M. Innate Immunity of the Lung : From Basic Mechanisms to Translational Medicine. *J Innate Immun*. 2018;10(5–6):487–501.

53. Zhang YB, He FL, Fang M et al. Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Mol Biol Rep.* 2009;36(6):1475–81.
54. Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA, Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31(3):358–64.
55. Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R, Prince A. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest.* 2004;113(10):1482–9.
56. Hoppstädter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, et al. Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir Res.* 2010;11(9):1–15.
57. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373–84.
58. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499–511.
59. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1–14.
60. Medzhitov R, Preston-hurlburt P, Jr CAJ. letters to nature A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394–7.
61. McClure R, Massari P. TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Front Immunol.* 2014;5(8):1–13.
62. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015;33(1):257–90.
63. Dunne A, Neill LAJO. The Interleukin-1 Receptor / Toll-Like Receptor Superfamily. *Sci STKE.* 2003;(2):1–18.
64. Takeda K, Akira S. Toll-Like Receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2015;109(14):1–10.
65. Luke A J O’Neill AGB. The family of five : TIR-domain- containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):353–64.
66. What-when-how., In *Depth Tutorials and Information. Introduction to the Immune*

- System ( The Immune System in Health and Disease ) ( Rheumatology ) Part 2. [Internet] [Internet]. 2021;1–12. Available from: <http://what-when-how.com/rheumatology/introduction-to-the-immune-system-the-immune-system-in-health-and-disease-rheumatology-part-2/>
67. Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors , ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res*. 2010;59(10):791–808.
  68. Rakoff-nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(1):57–63.
  69. Hennessy EJ, Parker AE, Neill LAJO. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(4):293–307.
  70. Tockman MS, Ph D, Anthonisen NR, Wright EC, Ph D. Airways Obstruction and the Risk for Lung Cancer. *Ann Intern Med*. 1987;106(4):512–8.
  71. Houghton AM, Mouded M, Shapiro SD. Common origins of lung cancer and COPD. *Nat Med*. 2008;14(10):1023–4.
  72. Allin KH, Bojesen SE, Nordestgaard BG. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Baseline C-Reactive Protein Is Associated With Incident Cancer and Survival in Patients With Cancer. 2015;27(13).
  73. David H. Pathology in Europe Rudolf Virchow and Modern Aspects of Tumor Pathology. *Pathol Res Pract* [Internet]. 1988;183(3):356–64. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338\(88\)80138-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0344-0338(88)80138-9)
  74. Parris BA, Farrell HEO, Fong KM, Yang IA. Chronic obstructive pulmonary disease ( COPD ) and lung cancer : common pathways for pathogenesis. 2019;11(6):2155–72.
  75. Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Donner CF. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1998;12(2):380–6.
  76. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease : molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22(4):672–88.
  77. Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, Qiu Y, Zhu J, Vignola AM, et al. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J*. 2007;30(3):467–71.
  78. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. Chronic Obstructive Pulmonary Disease 1

- New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378(9795):1015–26.
79. Bozinovski S, Vlahos R, Anthony D, McQualter J, Anderson G, Irving L, et al. COPD and squamous cell lung cancer: Aberrant inflammation and immunity is the common link. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):638–48.
  80. Fulop T, Larbi A, Kotb R PG. Immunology of Aging and Cancer Development. *Interdiscip Top Gerontol*. 2013;38:38–48.
  81. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011;12(6):492–9.
  82. Wilkinson TMA. Immune checkpoints in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Rev*. 2017;26(144).
  83. Kumar J, Surh Y. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat Res*. 2008;659(1–2):15–30.
  84. Fong Y, Hsu S, Wu C, Li T, Kao S. Lung Cancer Transforming growth factor - beta 1 increases cell migration and beta 1 integrin up-regulation in human lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2009;64(1):13–21.
  85. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2001;1(2):135–45. Available from: <https://doi.org/10.1038/35100529>
  86. Nowarski R, Gagliani N, Huber S, Flavell RA. Innate Immune Cells in Inflammation and Cancer. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2013;1(2):77–84. Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-13-0081>
  87. Wauters E, Janssens W, Vansteenkiste J, Decaluwé H, Heulens N, Thienpont B, et al. DNA methylation profiling of non-small cell lung cancer reveals a COPD-driven immune-related signature. *Thorax*. 2015;70(12):1113–22.
  88. Mark NM, Kargl J, Busch SE et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Alters Immune Cell Composition and Immune Checkpoint Inhibitor Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(3):325–36.
  89. Suhir H, Etzioni A. The Role of Toll-Like Receptor Signaling in Human Immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010;38(1):11–9.
  90. Watza D, Lusk CM, Dyson G, Purrington KS, Angela S, Neslund-dudas C, et al. COPD-dependent effects of genetic variation in key inflammation pathway genes on lung cancer risk. 2019;(11).

91. Iannuzzi MC, Maliarik M, Rybicki B. Genetic polymorphisms in lung disease : bandwagon or breakthrough ? *Respir Res.* 2002;3(1):15.
92. Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation , classification and ‘ race .’ *Nat Genet.* 2004;36(11):28–33.
93. Väli Ü, Brandström M, Johansson M, Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genet.* 2008;9(8):1–8.
94. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Res.* 1998;8(12):1229–31.
95. Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med.* 2005;56:303–20.
96. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, Hayden HS, Graves T, Hansen N, et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature.* 2008;453(7191):56–64.
97. Sunyaev S, Ramensky V BP. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet.* 2000;16(5):198–200.
98. Consortium IH. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789–96.
99. Casanova J, Abel L, Quintana-murci L. Human TLRs and IL-1Rs in Host Defense : Natural Insights from Evolutionary , Epidemiological , and Clinical Genetics. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:447–91.
100. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, et al. A Common Dominant TLR5 Stop Codon Polymorphism Abolishes Flagellin Signaling and Is Associated with Susceptibility to Legionnaires ’ Disease. *J Exp Med.* 2003;198(10):1563–72.
101. Hawn TR, Wu H, Grossman JM, Hahn BH, Tsao BP, Aderem A. A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(30):10593–7.
102. Rahman S, Shering M, Ogden NH, Lindsay R. Toll-like receptor cascade and gene polymorphism in host – pathogen interaction in Lyme disease. *J Inflamm Res.*

- 2016;9:91–102.
103. Kutikhin AG. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Hum Immunol* [Internet]. 2011;72(11):1095–116. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2011.07.307>
  104. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000;25(2):187–91.
  105. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci*. 2008;114(5):347–60.
  106. Johnson CM, Lyle EA, Katherine O, Stepensky VA, Yegin O, Alpsy E, et al. Cutting Edge: A Common Polymorphism Impairs Cell Surface Trafficking and Functional Responses of TLR1 but Protects against Leprosy. 2018;
  107. Hawn TR, Misch EA, Dunstan SJ, Thwaites GE, Lan NTN, Quy HT, et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. *Eur J Immunol*. 2007;37(8):2280–9.
  108. Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, et al. Human Intestinal Epithelial Cells Are Broadly Unresponsive to Toll-Like Receptor 2-Dependent Bacterial Ligands: Implications for Host-Microbial Interactions in the Gut. *J Immunol*. 2003;170(3):1406–15.
  109. Trejo-de AO, Herna P. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun*. 2014;15(4):199–209.
  110. Yu L, Chen S. Toll-like receptors expressed in tumor cells : targets for therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(9):1271–8.
  111. Kurt H, Ozbayer C, Bayramoglu A, Gunes HV, Degirmenci İ, Oner KS, et al. Determination of the Relationship Between rs4986790 and rs4986791 Variants of TLR4 Gene and Lung Cancer. *Inflammation*. 2016;39(1):166–71.
  112. Wu H, Gao H, Li A, Xie Y, Jia Z, Yang Z, et al. Impact of Genetic Variation in TLR4 3' UTR on NSCLC Genetic Susceptibility. *J Oncol*. 2020;2020(7593143).
  113. Caramori G, Adcock I. Gene – environment interactions in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*.

- 2006;6(5):323–8.
114. Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, et al. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(27):10143–8.
  115. Beane J, Sebastiani P, Liu G, Brody JS, Lenburg ME, Spira A, et al. Reversible and permanent effects of tobacco smoke exposure on airway epithelial gene expression. *Genome Biol*. 2007;8(9):201.
  116. Steiling K, Kadar AY, Bergerat A, Flanigon J, Sridhar S, Shah V, et al. Comparison of Proteomic and Transcriptomic Profiles in the Bronchial Airway Epithelium of Current and Never Smokers. *PLoS One*. 2009;4(4):5043.
  117. Young RP, Hopkins RJ, Hay BA, Epton MJ, Black PN, Gamble GD. Lung cancer gene associated with COPD: triple whammy or possible confounding effect? *Eur Respir J*. 2008;32(5):1158–64.
  118. de Andrade M, Li Y, Marks RS DC et al. Genetic variants associated with the risk of chronic obstructive pulmonary disease with and without lung cancer. *Cancer Prev Res*. 2012;5(3):365–73.
  119. Egeblad M, Nakasone ES WZ. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18(6):884–901.
  120. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. 2008;454(July).
  121. Cho WC, Kwan CK, Yau S, So PP, Poon PC AJ. The role of inflammation in the pathogenesis of lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(9):1127–37.
  122. Barreiro E, Femoselle C, Mateu-jimenez M, Sánchez-font A, Pijuan L, Gea J, et al. Oxidative stress and inflammation in the normal airways and blood of patients with lung cancer and COPD. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:859–71.
  123. Bezemer GFG, Sagar S, Bergenhenegouwen J Van, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD. Dual Role of Toll-Like Receptors in Asthma and. *Pharmacol Rev*. 2012;64(2):337–58.
  124. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer : An ancient link with novel potentials. 2007;2380(August):2373–80.
  125. McCall K.D., Muccioli M. BF. Toll-Like Receptors Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1223:81–97.



126. Martin R De, Schmid JA, Hofer-warbinek R. The NF- $\kappa$ B r Rel family of transcription factors in oncogenic transformation and apoptosis. *Mutat Res.* 1999;437(3):231–43.
127. Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, et al. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1285–97.
128. Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene.* 2008;27(2):161–7.
129. Kundu JK SY. Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat Res.* 2008;659(1–2):15–30.
130. Ke X, Wu M, Lou J, Zhang S, Huang P, Sun R, et al. Activation of Toll-like receptors signaling in non-small cell lung cancer cell line induced by tumor-associated macrophages. *Chin J Cancer Res.* 2015;27(1):181–9.
131. Gomes M, Coelho A, Araújo A. IL-6 polymorphism in non-small cell lung cancer: a prognostic value? *Tumour Biol.* 2015;36(5):3679–84.
132. Korneev K V, Atretkhany KN, Drutskaya MS, Grivennikov SI, Kuprash D V, Nedospasov SA. Cytokine TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine.* 2017;89:127–35.
133. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):125–39.
134. Qu Z, Sun F, Zhou J, Li L, Shapiro SD, Genetics M. Interleukin-6 Prevents the Initiation but Enhances the Progression of Lung Cancer. *Cancer Res.* 2015;75(16):3209–15.
135. Moghaddam SJ, Li H, Cho S, Dishop MK, Wistuba II, Ji L, et al. Promotion of Lung Carcinogenesis by Chronic Obstructive Pulmonary Disease – Like Airway Inflammation in a K-ras – Induced Mouse Model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(4):443–53.
136. Caetano MS, Zhang H, Cumpian AM, Gong L, Unver N, Ostrin EJ, et al. IL-6 blockade reprograms the lung tumor microenvironment to limit the development and progression of K-ras mutant lung cancer. *Cancer Res.* 2016;76(11):3189–99.
137. Toniatti C, Demartis A, Monaci P, Nicosia A, Ciliberto G. Synergistic trans-

- activation of the human C-reactive protein promoter by transcription factor HNF-1 binding at two distinct sites. *EMBO J.* 1990;9(13):4467–75.
138. Gutierrez-Arcelus M, Rich SS RS. Autoimmune diseases — connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. *Nat Rev Genet.* 2016;17(3):160–74.
  139. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. GOLD website [Internet]. 2017;(January 2017). Available from: [https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov\\_WMS.pdf](https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov_WMS.pdf)
  140. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest* [Internet]. 2017;151(1):193-203. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.010>
  141. Zhang L, Zhao J, Cui G, Wang H, Wang DW. Genotyping on ALDH2 : Comparison of Four Different Technologies. *PLoS One.* 2015;10(3):1–9.
  142. MBL International | A JSR Life Sciences Company. The principle and method of Enzyme-linked Immunosorbent assay ( ELISA ) The principle. [Internet] [Internet]. 2021;1–9. Available from: <https://www.mblintl.com/resources/scientific-resources/fundamentals-for-planning-research/the-principle-and-method-of-enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>
  143. EU-OSHA. Exposure to carcinogens and work-related cancer : A review of assessment methods. 2014.
  144. Rutkowski MR, Stephen TL, Svoronos N, Allegranza MJ, Tesone AJ, Perales-puchalt A, et al. Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell.* 2015;27(1):27–40.
  145. Mirza S, Clay RD, Koslow MA, Scanlon PD. COPD Guidelines: A Review of the 2018 GOLD Report. *Mayo Clin Proc.* 2018;93(10):1488–502.
  146. Truedsson M, Malm J, Sahlin KB, Bugge M, Wieslander E, Dahlbäck M, et al. Biomarkers of early chronic obstructive pulmonary disease ( COPD ) in smokers and former smokers . Protocol of a longitudinal study. *Clin Transl Med.* 2016;5(1):9.

147. Manuscript A, Oscillatory C, Supporting N. NIH Public Access. *Brain*. 2010;188(2):126–32.
148. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous Lung Diseases and Lung Cancer Risk : A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2011;6(3):1–10.
149. Smith MC, Wrobel JP. Epidemiology and clinical impact of major comorbidities in patients with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:871–88.
150. Cavallès A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S, et al. Comorbidities of COPD. *Eur Respir Rev*. 2013;22(130):454–75.
151. Tan JY, Tang YC HJ. Gut Microbiota and Pathogenesis of Organ Injury. 2020. 55–72 p.
152. Wu M, Jian Z, Huang J, Jan C, Nfor ON, Jhang K, et al. Post-inhaled corticosteroid pulmonary tuberculosis and pneumonia increases lung cancer in patients with COPD. *BMC Cancer*. 2016;16(1):1–8.
153. De Torres JP, Marín JM, Casanova C, Cote C, Carrizo S, Cordoba-Lanus E, et al. Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(8):913–9.
154. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative Relationships between Cigarette Smoking and Ventilatory Function . *Am Rev Respir Dis*. 1977;115(2):195–205.
155. Young RP, Hopkins R, Eaton TE. Forced expiratory volume in one second: not just a lung function test but a marker of premature death from all causes. *Eur Respir J*. 2007;30(4):616–22.
156. Harvey B, Strulovici-barel Y, Kaner RJ, Sanders A, Vincent TL, Mezey JG, et al. Risk of COPD with obstruction in active smokers with normal spirometry and reduced diffusion capacity. *Eur Respir J*. 2015;46(6):1589–97.
157. de-Torres, Juan P, Wilson DO, Sanchez-salcedo P, Weissfeld JL, Berto J, Campo A, et al. Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development and Validation of the COPD Lung Cancer Screening Score. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(3):285–91.
158. de-Torres, Juan P, Marín JM, Casanova C, Pinto-plata V, Divo M, Cote C, et al. Identification of COPD Patients at High Risk for Lung Cancer Mortality Using the COPD-LUCSS-DLCO. *Chest*. 2016;149(4):936–42.

159. McDonough JE, Yuan R, Suzuki M et al. Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2011;365(17):1567–75.
160. Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA et al. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Ann Intern Med.* 2005;142(4):233–9.
161. Adcock IM, Caramori G, Barnes PJ. Chronic Obstructive pulmonary disease and lung cancer: New molecular insights. *Respiration.* 2011;81(4):265–84.
162. Clapper ML. Genetic Polymorphism and Cancer Risk. *Curr Oncol Rep.* 2000;2(3):251–6.
163. Rahman I AI. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J.* 2006;28(1):219–42.
164. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S et al. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med.* 2004;350(26):2645–53.
165. Sarir H, Mortaz E, Janse WT, Givi ME, Nijkamp FP, Folkerts G. IL-8 production by macrophages is synergistically enhanced when cigarette smoke is combined with TNF- $\alpha$ . *Biochem Pharmacol.* 2010;79(5):698–705.
166. Karimi K, Sarir H, Mortaz E, Smit JJ, Hosseini H, De Kimpe SJ, et al. Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. *Respir Res.* 2006;7:1–11.
167. Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res.* 2005;6:2–9.
168. Decramer M, Janssens W, Miravitlles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2012;379(9823):1341–51.
169. Mattson JD, Haus BM, Desai B et al. Enhanced acute responses in an experimental exposure model to biomass smoke inhalation in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res.* 2008;34(10):631–62.
170. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet.* 2009;374(9691):733–43.
171. Chaudhuri N, Paiva C, Donaldson K, Duffin R, Parker LC, Sabroe I. Diesel exhaust particles override natural injury-limiting pathways in the lung. *Am J Physiol Lung*

- Cell Mol Physiol. 2010;299(2):263–71.
172. Manzel LJ, Shi L, Shaughnessy PTO, Thorne PS, Look DC. Inhibition by Cigarette Smoke of Nuclear Factor- $\kappa$ B – Dependent Response to Bacteria in the Airway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):155–65.
  173. Hodge S, Hodge G, Ahern J, Jersmann H, Holmes M, Reynolds PN. Smoking Alters Alveolar Macrophage Recognition and Phagocytic Ability Implications in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(6):748–55.
  174. Rich AM, Hussaini HM, Venkata P, Parachuru B, Seymour GJ. Toll-like receptors and cancer , particularly oral squamous cell carcinoma. *Front Immunol*. 2014;5(9):464.
  175. Shaykhiev R, Crystal RG. Innate immunity and chronic obstructive pulmonary disease: A mini-review. *Gerontology*. 2013;59(6):481–9.
  176. Auerbach O, Forman JB, Gere JB et al. Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress. *N Engl J Med*. 1957;256(3):97–104.
  177. Berndt A, Leme AS, Shapiro SD. Emerging genetics of COPD. *EMBO Mol Med*. 2012;4(11):1144–55.
  178. Keller A, Fehlmann T, Ludwig N, Kahraman M, Laufer T, Backes C, et al. Genome-wide MicroRNA Expression Profiles in COPD: Early Predictors for Cancer Development. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2018;16(3):162–71.
  179. Yeh D, Huang L, Chen Y, Huang CF, Chuang T. Interplay between Inflammation and Stemness in Cancer Cells : The Role of Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol Res*. 2016;2016(4368101).
  180. Birnie R, Bryce SD, Roome C, Dussupt V, Droop A, Lang SH, et al. Open Access Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biol*. 2008;9(5):R83.
  181. Pinto A, Morello S, Sorrentino R. Lung cancer and Toll-like receptors. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(9):1211–20.
  182. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and

- apoptosis resistance. *Mol Immunol.* 2007;44(11):2850–9.
183. Zhou S-X, Li F-S, Qiao Y-L, Zhang X-Q, Wang Z-D. Toll-like Receptor 5 Agonist Inhibition of Growth of A549 Lung Cancer Cells in Vivo in a Myd88 Dependent Manner. *Asian Pacific J Cancer Prev [Internet].* 2012;13(6):2807–12. Available from:  
<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=POCPA9&py=2012&vnc=v13n6&sp=2807>
184. El-omar EM, Ng MT, Hold GL. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene.* 2008;27(2):244–52.
185. Ridnour LA, Cheng RYS, Switzer CH, Heinecke JL, Glynn S, Young HA, et al. Molecular Pathways: Toll-like Receptors in the Tumor Microenvironment—Poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity. 2019;19(6):1340–6.
186. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med.* 2008;359(22):2355–65.
187. O’Neill LAJ. How Toll-like receptors signal: What we know and what we don’t know. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(1):3–9.
188. Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(5):1–14.
189. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, Sadikot RT, Yull FE, Blackwell TS, et al. Host Nuclear Factor- K B Activation Potentiates Lung Cancer Metastasis. *Mol Cancer Res.* 2008;6(3):364–71.
190. Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer.* 2010;10(3):1–9.
191. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol.* 2012;33(11):571–7.
192. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010;22(5):347–52.
193. Gabrilovich DI NS. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162–74.
194. Kim S, Takahashi H, Lin W, Descargues P, Kim Y, Luo J, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis.

- Nature. 2009;457(7225):102–6.
195. Nie W, Xue L, Sun G, Ning Y. Interleukin-6 – 634C / G polymorphism is associated with lung cancer risk : a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(5):4581–7.
  196. Córdoba-Lanús E, de-Torres JP, López-Aguilar C et al. Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish Population. *Respir Med.* 2008;102(12):1805–11.

## 11 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28.02.1988.godine u Koprivnici, pohađala sam osnovnu i srednju školu u Križevcima, gdje sam 2006. godine završila matematički smjer Gimnazije I.Z.Dijankovečkog. 2006. godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na kojem sam i diplomirala u srpnju 2012. godine. U kolovozu 2011. odrađujem stručnu praksu iz područja opće kirurgije (Hospital Nacional General "Dr. Juan José Fernández", San Salvador, El Salvador). Kroz dvomjesečni period (kolovoz-listopad) 2012. odrađujem stručnu praksu iz područja intenzivnog liječenja (McGill University Health Centre, Royal Victoria Hospital, Montreal, Quebec). Nakon pripravničkog staža u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu sam u studenom 2013. godine položila državni ispit, te iste godine upisala Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U lipnju 2014. godine započinjem specijalizaciju iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivnog liječenja na Klinici za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivno liječenje KBC-a Zagreb, u sklopu koje u svibnju 2018. završavam Poslijediplomski specijalistički studij Anesteziologija, reanimatologija i intenzivna medicina kirurških struka na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit iz anesteziologije, reanimatologije i intenzivne medicine položila sam u studenom 2019. godine, te od tada radim kao specijalistica na Klinici za torakalnu kirurgiju KBC-a Zagreb. Od svibnja 2021. radim kao specijalistica anesteziologije, reanimatologije i intenzivne medicine na Klinici za anesteziologiju reanimatologiju i intenzivnu medicinu KB Dubrava. Član sam Hrvatske liječničke komore i Hrvatskog društva za anesteziologiju, reanimatologiju i intenzivnu medicinu. Sudjelovala sam na međunarodnim i domaćim kongresima, godišnjim sastancima i skupovima. Govorim engleski jezik, a pasivno se služim njemačkim, španjolskim i francuskim jezikom.



## PRILOZI

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

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

### Prilog 2. Indeks tjelesne mase (eng. BMI, *Body Mass Index*)

<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Stupanj uhranjenosti</b>
< 18,49	Pothranjenost (snižena tjelesna masa)
18,5 - 24,99	Normalna uhranjenost (primjerena tjelesna masa)
25,0 - 29,99	Povećana tjelesna masa
30,0 - 34,99	Pretilost 1. stupnja
35,0 - 39,99	Pretilost 2. stupnja
≥ 40,0	Pretilost 3. stupnja

**Irena Sokolović**

**DISERTACIJA**

**2021.**

