Utjecaj agonista TLR receptora na vijabilnost NCI-H292 epitalnih stanica

Sladoljev, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:639295

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Lucija Sladoljev

Utjecaj agonista TLR receptora na vijabilnost NCI-H292 epitelnih stanica

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija 1 Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Lade Rumora.

Zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na strpljenju i pomoći, posebno asistentici Andrei Hulina na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i prof. dr. sc. Ladi Rumora, pod čijim je mentorstvom izrađen ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest 2
1.1.1. Definicija 2
1.1.2. Prevalencija i troškovi 2
1.1.3. Čimbenici rizika 2
1.1.4. Dijagnoza i klasifikacija bolesti 3
1.1.5. Klinički oblici bolesti 6
1.2. Patogeneza KOPB-a 7
1.2.1. Kronična upala 7
1.2.1.1. Citokini 8
1.2.2. Proteaze i antiproteaze 8
1.2.3. Oksidacijski stres 9
1.2.4. Apoptoza 9
1.3. TLR receptori i KOPB 11
1.3.1. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture 11
1.3.2. Struktura i ligandi TLR receptora 11
1.3.3. Signalni put TLR receptora 13
1.3.4. Uloga TLR receptora u KOPB-u 14
1.3.5. Djelovanje LTA i LPS-a na TLR2 i TLR4 receptore 15
2. OBRAZLOŽENJE TEME 16
3. MATERIJALI I METODE 18
3.1. Kultura stanica 19
3.1.1. Presađivanje stanica 19
3.1.2. Tretiranje stanica 20
3.2. Priprema staničnih lizata 21

3.3. Test vijabilnosti i brojanje stanica tripanskim plavilom 22
3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH 24
3.5. MTS test 26
3.6. Statistička obrada rezultata 27
4. REZULTATI I RASPRAVA 28
4.1. Određivanje optimalnog broja stanica i uvjeta kultiviranja za LDH test 29
4.2. Utjecaj načina pripreme staničnih lizata na katalitičku aktivnost LDH 31
4.3. Utjecaj različitih temperatura, stajanja uzorka i inhibitora proteaza na aktivnost LDH NCI-H292 stanica 32
4.4. Određivanje optimalnog broja stanica i vremena inkubacije za MTS test 34
4.5. Utjecaj LTA i LPS-a na vijabilnost NCI-H292 stanica 37
4.5.1. Određivanje vijabilnosti mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH 37
4.5.2. Određivanje vijabilnosti MTS testom 41
5. ZAKLJUČCI 45
6. LITERATURA 48
7. SAŽETAK/SUMMARY 54
8. PRILOZI 57
8.1. Popis kratica 58
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD . 60

1. UVOD

1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest

1.1.1. Definicija

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je učestala bolest koju je moguće spriječiti i liječiti, a karakterizirana je stalnim ograničenjem protoka zraka koje je uglavnom progresivno. Bolest je povezana s pojačanom kroničnom upalom dišnih putova i pluća izazvanom stranim česticama i plinovima, a egzacerbacije i komorbiditeti doprinose pogoršanju bolesti (definicija KOPB-a prema dokumentu Svjetske inicijative za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (GOLD, *engl*. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) iz 2015. godine) (www.goldcopd.org).

1.1.2. Prevalencija i troškovi

KOPB predstavlja jedan od glavnih svjetskih zdravstvenih problema, a broj oboljelih u stalnom je porastu. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, *engl*. World Health Organization), 1990. godine bila je šesti najčešći uzrok smrti u svijetu, dok se 2012. godine popela čak na treće mjesto. Porast mortaliteta uzrokovan je pandemijskim porastom broja pušača, ali i smanjenjem broja smrtnih slučajeva uzrokovanih nekim drugim bolestima kao što su npr. ishemijska bolest srca i infekcije, te zbog starenja populacije (www.goldcopd.org; www.who.int.com). Istraživanja iz 2010. pokazala su da u svijetu od ove bolesti boluje 210 milijuna ljudi, odnosno 8-10 % osoba starijih od 40 godina (Diaz-Guzman i Mannino, 2013). Međutim nije moguće dobiti točne podatke zbog varijabilnosti u dijagnostičkim kriterijima, metodama ispitivanja i samim metodama analize (www.goldcopd.com).

KOPB je povezan i sa značajnim ekonomskim opterećenjem. Izravni troškovi za respiracijske bolesti u Europskoj uniji iznose 6% ukupnog bućeta zdravstvenog sustava, od čega se 56 % sredstava, odnosno 38,6 milijardi eura, potroši na liječenje KOPB-a (www.goldcopd.org).

1.1.3. Čimbenici rizika

Najčešći čimbenik rizika za razvoj KOPB-a je udisanje duhanskog dima porijeklom iz cigareta, lula, cigara i drugih vrsta duhanskih proizvoda, kao i duhanski dim iz okoline. Međutim samo 15-20 % pušača razvije bolest (Barnes, 2014; Rovina, 2013; www.goldcopd.com). Ostali rizični čimbenici uključuju izlaganje organskoj i anorganskoj prašini te kemikalijama ili ispušnim plinovima na radnom mjestu tijekom duljeg vremena, te unutarnje zagađenje zraka nastalo gorenjem biomase koja se koristi za kuhanje i grijanje u slabo ventiliranim stambenim

prostorima. Potonje se naručito odnosi na žene u zemljama u razvoju. Utjecaj vanjskog zagađenja zraka je malen u usporedbi s pušenjem, međutim ono pridonosi ukupnosti udahnutih zagađenih čestica i može uzrokovati dodatne probleme osobama s KOPB-om.

KOPB je posljedica interakcije okolišnih i genskih čimbenika, budući da će samo manji broj ljudi izložen spomenutim česticama razviti bolest. 1-3 % ljudi zbog nasljednog manjka α_1-antitripsina u kombinaciji s izloženosti štetnim tvarima razvije bolest. Također, važno je napomenuti da su neka istraživanja pokazala da su žene osjetljivije na cigaretni dim (CS, *engl*. cigarette smoke) od muškaraca. Ostali čimbenici koji povećavaju rizik razvoja KOPB-a su svi čimbenici koji utječu na razvoj pluća za vrijeme trudnoće i djetinjstva (niska porođajna težina, respiracijske infekcije i slično). Kronični bronhitis i astma također povećavaju rizik obolijevanja od ove bolesti (Diaz-Guzman i Mannino, 2013; www.goldcopd.com).

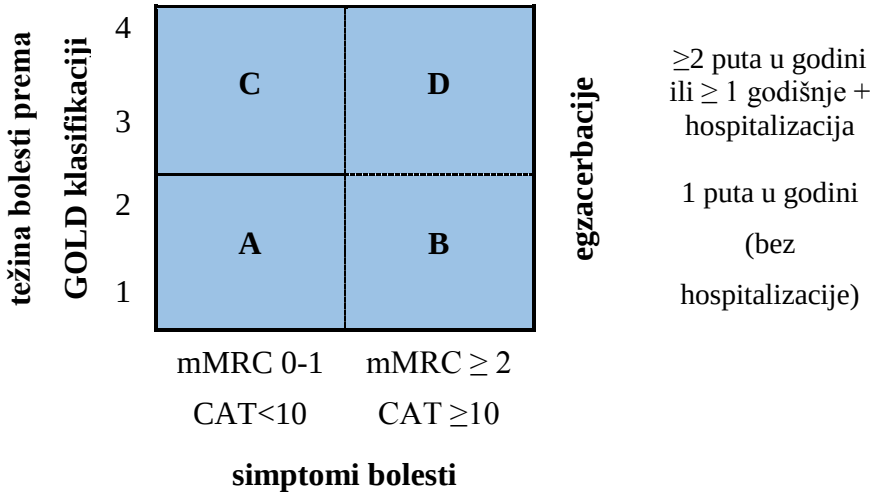
1.1.4. Dijagnoza i klasifikacija bolesti

Klinička dijagnoza KOPB-a postavlja se na temelju rezultata spirometrije. Preporuča je se napraviti kod osoba s kroničnim kašljem, dispnejom i produkcijom ispljuvka uz izloženost rizičnim čimbenicima. Forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi (FEV_1, *engl*. forced expired volume in 1 second) je volumen zraka izdahnut tijekom prve sekunde nakon maksimalnog udaha, a forsirani vitalni kapacitet (FVC, *engl.* forced vital capacity) je maksimalni volumen zraka izdahnut maksimalnom snagom. Ukoliko je omjer FEV_1/FVC nakon primjene bronhodilatatora <0,70 kod osobe postoji opstrukcija dišnih putova, odnosno ima KOPB. Prema rezultatima spirometrije nakon primjene bronhodilatatora težina bolesti se klasificira u četiri stadija, GOLD I - GOLD IV (tablica 1.1.).

Klasifikacija KOPB-a prema težini opstrukcije dišnih putova (s obzirom na FEV_1 nakon primjene bronhodilatatora)		
GOLD I	blaga KOPB	$FEV_1 \geq 80\%$ predviđenog
GOLD II	umjerena KOPB	$50\% \leq FEV_1 < 80\%$ predviđenog
GOLD III	teška KOPB	$30\% \leq FEV_1 < 50\%$ predviđenog
GOLD IV	vrlo teška KOPB	$FEV_1 < 30\%$ predviđenog

Tablica 1.1. Bolesnicima u svim GOLD stadijima zajednički je $FEV_1/FVC < 0,70$. U skupine se smještaju prema udjelu FEV_1 nakon primjene bronhodilatatora u odnosu na očekivani FEV_1 s obzirom na spol, dob, visinu te etničku pripadnost (www.goldcopd.com).

Međutim, prema najnovijim GOLD smjernicama, osim rezultata spirometrije za procjenu težine bolesti bitno je uključiti i prisustvo simptoma bolesti, rizik od egzacerbacija (periodi akutnog pogoršanja simptoma) te prisustvo komorbiditeta. S obzirom na ta četiri parametra oboljeli od KOPB-a svrstavaju se u četiri skupine, A – D (slika 1.1 i tablica 1.2.). Ova klasifikacija smatra se sveobuhvatnijom i boljom u odnosu na GOLD klasifikaciju s obzirom na to da uzima u obzir više parametara nužnih za procjenu stvarne težine bolesti čime je olakšan pristup individualizaciji terapije (www.goldcopd.com).



Slika 1.1. Težina simptoma bolesti određuje se testom za procjenu KOPB-a (CAT, *engl*. COPD assessment test) ili modificiranim upitnikom Vijeća za medicinska istraživanja (mMRC, *engl*. modified Medical research council). CAT je upitnik za osobe s KOPB-om dizajniran s ciljem mjerenja utjecaja progresije bolesti na svakodnevni život bolesnika, a mMRC testom se mjeri težina dispneje kojom se može procijeniti težina bolesti i rizik mortaliteta (www.catestonline.org; www.goldcopd.com).

kategorija	karakteristike	spirometrijska klasifikacija	egzacerbacije u godini dana	mMRC	CAT
A	nizak rizik, manje simptoma	GOLD 1 – 2	0-1, bez hospitalizacije	0 - 1	<10
B	nizak rizik, više simptoma	GOLD 1 - 2	0-1, bez hospitalizacije	≥2	≥10
C	visok rizik, manje simptioma	GOLD 3 - 4	≥2 ili ≥1 s hospitalizacijom	0 - 1	<10
D	visok rizik, više simptoma	GOLD 3 - 4	≥2 ili ≥1 s hospitalizacijom	≥2	≥10

Tablica 1.2. Prikaz podjele bolesnika s KOPB-om po skupinama A – D.

1.1.5. Klinički oblici bolesti

Na temelju promjena u dišnim putovima razlikujemo dva temeljna oblika KOPB-a: kronični bronhitis i emfizem (Fischer, 2011).

Kronični bronhitis definiran je dugotrajnim kašljem i stvaranjem ispljuvka, a nastaje kao rezultat odgovora imunosnog sustava na udahnute štetne čestice. Karakteriziran je upalom epitela centralnih dišnih putova i žlijezda koje stvaraju sluz. Ova upala povezana je s pojačanim stvaranjem sluzi, zadebljanjem stijenke bronha, smanjenim uklanjanjem čestica putem cilijarnih stanica te povećanom propusnošću epitelne barijere dišnih putova. Kronični bronhitis doprinosi težini bolesti u kasnijim stadijima kada povećava rizik nastanka egzacerbacija koje mogu ubrzati smanjenje FEV_1 (MacNee, 2005).

Emfizem se definira kao povećanje distalnih dišnih prostora uzrokovano razaranjem stijenki alveola. Gubitkom integriteta alveola smanjuje se elastičnost pluća što vodi do slabe izmjene plinova u alveolama i zadržavanja zraka. Povezan je sa značajnim padom FEV_1 (Vestbo, 2014; MacNee, 2005; www.goldcopd.com).

Bolesnici s KOPB-om pokazuju različite karakteristične značajke kroničnog bronhitisa, emfizema i/ili astme, ali svi imaju kliničke simptome opstrukcije dišnih putova (Fischer, 2011).

Međutim, prema novijim podacima, odbacuje se pojam kliničkih oblika KOPB-a te ih zamjenjuje novi pojam – fenotip. Fenotip KOPB-a predstavlja jednu ili kombinacije karakteristika bolesti koje opisuju razlike između pojedinih osoba s ovom bolešću ovisno o klinički značajnim ishodima bolesti (simptomima, egzacerbacijama, odgovoru na terapiju, brzini kojom bolest napreduje te smrtnom ishodu). To znači da će prognoza, rizik egzacerbacija i odgovor na terapiju ovisiti o tome kojem fenotipu KOPB-a određeni bolesnik pripada. Jedan bolesnik može imati kombinaciju više fenotipova. Predloženi fenotipovi KOPB-a su: astma, emfizem, plućna funkcija (FEV_1), kaheksija, kronični bronhitis, česte egzacerbacije i sistemska upala (Vestbo, 2014).

1.2. Patogeneza KOPB-a

Klinička slika karakteristična za KOPB nastaje kombinacijom genske predispozicije i izloženosti rizičnim čimbenicima za razvoj bolesti. Tome u prilog govori činjenica da se kod svih pušača javlja upalni odgovor u plućima, ali samo 1/5 razvije bolest. Razlog tome je to što su određene osobe osjetljivije na djelovanje štetnih čestica te se kod njih javlja pojačan ili neprimjeren upalni odgovor koji dovodi do oštećenja pluća. Osim toga, kronična upala kod takvih pojedinaca nastavlja se i nakon prestanka pušenja (Rovina, 2013; MacNee, 2005).
Osim kronične upale smatra se da ulogu u nastanku bolesti imaju oksidacijski stres, neravnoteža proteaza i antiproteaza te propadanje alveola putem apoptoze (Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005).

1.2.1. Kronična upala

Kronična upala u plućima uzrokuje dva glavna patološka procesa odgovorna za opstrukciju dišnih putova. To su remodeliranje i sužavanje malih dišnih putova te emfizem.
U nastanku upale kod KOPB-a uključeni su i urođeni (neutrofili, makrofagi, eozinofili, mastociti, NK stanice i dendritične stanice) i stečeni imunosni odgovor (T i B limfociti), ali i strukturne stanice (epitelne i endotelne stanice te fibroblasti) (Barnes, 2014; Rovina, 2013).
Kod osoba s KOPB-om povećana je infiltracija upalnih stanica, naručito $CD8^+$ T limfocita i makrofaga, u centralne dišne putove (MacNee, 2005).
Makrofagi igraju glavnu ulogu u patofiziologiji bolesti i smatra se da su upravo oni odgovorni za kroničnu upalu. Njihov broj u dišnim putovima je 5-10 puta veći u osoba s KOPB-om. Uočena je korelacija između broja makrofaga i težine bolesti. Pod utjecajem iritansa iz okoliša, kao što je CS i dim nastao gorenjem biomase, aktiviraju se makrofagi i epitelne stanice pluća koji zatim otpuštaju upalne medijatore: čimbenik tumorske nekroze α (TNF-α, *engl*. tumour necrosis factor), interleukin (IL) 8, IL-1β, IL-6 i mnoge druge. Makrofagi potiču stvaranje sluzi i metaloproteinaza matriksa (MMP, *engl*. matrix metalloproteinase) koje doprinose uništenju alveola, dok su epitelne stanice važne u obrani dišnih putova zbog produkcije ispljuvka te sekrecije antioksidansa, antiproteaza i defenzina. Makrofagi bolesnika s KOPB-om su u usporedbi s onima zdravih pušača aktivniji, otpuštaju više upalnih proteina, imaju veću proteolitičku aktivnost za elastin koju još dodatno pojačava izloženost CS-u. Osim toga makrofagi pušača i oboljelih od KOPB-a imaju i produljeni životni vijek (Barnes, 2014; Rovina, 2013; Sarir i sur., 2008; MacNee, 2005). Alveolarni makrofagi monocitnog podrijetla bolesnika

s KOPB-om imaju slabiju moć fagocitiranja bakterija, a CS i druge štetne čestice mogu oslabiti odgovor epitelnih stanica što bi mogli biti odlučujući čimbenici kronične kolonizacije donjih dišnih putova bakterijama kao što su *Haemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae* (Barnes, 2014).

Broj $CD8^+$ T limfocita u dišnim putovima obično je povišen kod infekcija pa je moguće da uzrok njihovom povišenom broju u bolesnika s KOPB-om leži u kroničnoj bakterijskoj ili virusnoj kolonizaciji donjeg dišnog sustava. Moguće je da su uključeni i autoimuni mehanizmi. CS bi mogao oštetiti dišne putove čime bi se mogli stvarati antigeni koji zatim uzrokuju upalni odgovor. $CD8^+$ T limfociti uzrokuju apoptozu alveolarnih epitelnih stanica što u konačnici dovodi do emfizema (Barnes, 2014; MacNee, 2005).

1.2.1.1. Citokini

Citokini imaju glavnu ulogu u kroničnoj upali prisutnoj kod bolesnika s KOPB-a. To su mali proteini koji vezanjem za receptore aktiviraju transkipcijske čimbenike, npr. jezgrin čimbenik kappa B (NF-κB, *engl*. nuclear factor kappa B), koji pak potiču transkripciju novih upalnih medijatora. Važni su u regulaciji stanične smrti, modificiraju vaskularnu endotelnu permeabilnost te reguliraju nakupljanje krvnih stanica u upaljenom tkivu čime se pojačava upala. Stvaraju ih različite stanice, uključujući epitelne, endotelne, glatke mišićne stanice, fibroblaste, T-limfocite, makrofage i monocite. Otkriveno je preko 50 različitih citokina koji imaju ulogu u patogenezi KOPB-a, primjerice TNF-α, IL-1β i IL-6 (Takeuchi, 2010; Barnes, 2008; Sarir i sur., 2008; Barnes, 2004).

1.2.2. Proteaze i antiproteaze

Razgradnja elastina djelovanjem elastaze smatra se kritičnim mehanizmom patogeneze emfizema u pušača budući da njegovim razaranjem pluća gube na elastičnosti. Pretpostavlja se da je pojačana razgradnja elastina posljedica neravnoteže proteaza i antiproteinaza kod osoba s KOPB-om. Smatra se da je MMP9 podrijetlom iz makrofaga, neutrofila i epitelnih stanica odgovoran za povećanu razgradnju elastina, kao i nasljedni nedostatak α_1 antitripsina, inhibitora proteaza (Barnes, 2014; Demedts i sur., 2008; MacNee, 2005).

1.2.3. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je stanje neravnoteže oksidansa i antioksidansa koje dovodi do oštećenja lipida, proteina i DNA. Postoje dokazi pojačanog oksidacijskog stresa kod pušača i bolesnika s KOPB-om. Otkriveno je da neutrofili, makrofagi i epitelne stanice bolesnika otpuštaju reaktivne kisikove spojeve (ROS, *engl*. reactive oxygen species). Oni dovode do oksidacije arahidonske kiseline i formiranja izoprostana koji uzrokuju bronhokonstrikciju. Oksidansi prisutni u CS-u mogu izravno oštetiti elastin i kolagen u plućima, ali i neizravno, ometajući pravilnu sintezu i popravak elastina, te tako dovesti do emfizema pluća. ROS aktiviraju NF-κB koji potiče transkripciju brojnih upalnih gena, što rezultira pojačanim upalnim odgovorom (Barnes, 2014; MacNee, 2005).

1.2.4. Apoptoza

Apoptoza je ključna za održavanje homeostaze tkiva, te je u ravnoteži s proliferacijom i diferencijacijom stanica. Apoptoza alveolarnih epitelnih i endotelnih stanica u kombinaciji s gubitkom proliferacije ovih strukturnih stanica u plućima oboljelih od KOPB-a dovodi do razaranja plućnog tkiva (Demedts i sur., 2008).

Apoptoza se naziva i programiranom staničnom smrću. To je precizno reguliran proces koji omogućuje uklanjanje neželjenih ili oštećenih stanica. Tijekom apoptoze, kromosomska DNA obično je fragmentirana, kromatin se kondenzira i jezgra se raspada u manje dijelove. U konačnici se i sama stanica fragmentira u dijelove okružene membranom (apoptozna tjelešca). Makrofagi i druge fagocitne stanice odmah prepoznaju i uklanjaju fagocitozom takve apoptozne stanice, a da pri tome u potpunosti ostanu očuvane susjedne zdrave stanice.

Nasuprot tomu, nekroza je slabije kontroliran proces umiranja stanica, a nastaje zbog snažnog akutnog oštećenja. Tijekom nekroze stanica bubri i dolazi do kidanja stanične membrane te se stanični sadržaj oslobađa u okolinu uzrokujući upalu i oštećenje susjednih stanica (Demedts i sur., 2008; Cooper i sur., 2004).

Stanična smrt strukturnih stanica pluća kao odgovor na CS povezuje se s manjkom čimbenika rasta, naručito vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF, *engl*. vascular endothelial growth factor), oštećenjima uzrokovanim oksidacijskim stresom i posljedičnom upalom te neravnotežom proteaza i antiproteaza (Morissette i sur., 2009; Demedts i sur., 2008).

Sva četiri prethodno navedena procesa, kronična upala, oksidacijski stres, neravnoteža proteaza i antiproteaza te apoptoza, međusobno su povezani i ključni u patogenezi KOPB-a (Morissette i sur., 2009).

1.3. TLR receptori i KOPB

1.3.1. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture

Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRR, *engl*. Pattern recognition receptors) dio su stečenog imuniteta te im se pripisuje ključna uloga u raznim plućim bolestim, uključujući i KOPB (Optiz i sur., 2010).

PRR receptori eksprimirani su u alveolarnim makrofagima, plućnim epitelnim stanicama, dendritičnim stanicama, ali i drugim stanicama imunosnog sustava.

Odgovorni su za prepoznavanje različitih mikroorganizama, ali i endogenih molekula koje se otpuštaju iz ozlijeđenog tkiva. Oni prepoznaju molekulske strukture različitih mikroorganizama (PAMP, *engl*. pathogen-associated molecular pattern) i molekulske strukture nastale oštećenjem (DAMP, *engl*. damage-associated molecular pattern) koje se obično nalaze unutar stanica, a otpuštaju se tijekom staničnog stresa ili ozlijede u izvanstanični okoliš. Prepoznavanjem PAMP i DAMP molekula povećava se transkripcija gena odgovornih za upalni odgovor. Sintetiziraju se citokin, interferoni i kemokini koji onda aktiviraju susjedne stanice i reguliraju nakupljanje makrofaga i neutrofila.

Otkriveno je nekoliko podskupina PRR receptora: receptori slični Toll receptoru *Drosophila* vrste (TLR, *engl*. Toll-like receptor), receptori slični oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR, *engl*. nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor), lektinski receptor tipa C (CLR, *engl*. C-type lectin receptor) i receptori slični genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (RLR, *engl*. retinoic acid-inducibile gene 1 (RIG-I)-like receptor) (Takeuchi i Akira, 2010; Optiz i sur., 2010).

Jaka i/ili kronična stimulacija PRR receptora PAMP-ovima, DAMP-ovima i inhaliranim česticama uključena je u remodeliranje i razaranje plućnog parenhima koje potencijalno vodi k razaranju stijenki alveola, odnosno emfizemu (Optiz i sur., 2010).

1.3.2. Struktura i ligandi TLR receptora

TLR receptori nazvani su prema Toll receptorima nađenima u vinskoj mušici, *Drosophila melanogaster*, nakon otkrića strukturalne i funkcionalne sličnost Toll receptora i novootkivenih receptora u sisavaca. Do sada je otkiveno 11 različitih TLR receptora u ljudi (Bezemer i sur., 2012). To su transmembranski receptori tipa I sastavljeni od veznog mjesta za ligand na N-kraju, transmembranskog dijela i citoplazmatske signalne domene na C-kraju (Botos i sur.,

2011). Nalazimo ih u staničnoj membrani (TLR1, 2, 4-6, 10) ili unutar stanice u lizosomalnim i endosomalnim membranama (TLR3, 7-9, 11) (Yarovinsky, 2014; Optiz, 2010).

TLR receptori koji se nalaze u staničnoj membrani sadrže izvanstanično područje oblika potkove koje se sastoji uglavnom od ponavljajućih slijedova bogatih leucinom (LRR, *engl*. leucine-rich repeat) koje omogućuje prepoznavanje egozogenih i endogenih molekula (Bezemer i sur., 2012; Sarir i sur., 2008; Mollen i sur., 2006). Svi TLR receptori sadrže visoko očuvanu citoplazmatsku domenu koja je homologna kod TLR i IL-1 receptora (TIR, *engl*. Toll/interleukin-1 receptor homology domain), a neophodna je za prijenos signala u stanicu (Optiz i sur., 2010; Mollen i sur., 2006). Vezanje liganda inducira konformacijsku promjenu u TLR receptoru te dolazi do homo- ili heterodimerizacije. Većina se receptora homodimerizira, dok TLR2 tvori heterodimere s TLR1 i TLR6 (Bezemer i sur., 2012).

Ligandi TLR receptora su različite PAMP i DAMP molokule. TLR 2 i TLR4 su glavni receptori koji prepoznaju različite komponente bakterijske stanične stijenke. TLR2 receptori prepoznaju peptidoglikan, lipoproteine i lipoteičnu kiselinu (LTA, *engl*. lipoteichoic acid) gram-pozitivnih bakterija, npr. *S. Pneumoniae*. Osim toga, prepoznaju i mikobakterijski lipoarabinomanan. Heterodimerizacija TLR2 receptora omogućuje TLR1/2 heterodimeru da prepoznaje drugačije molekule od TLR2/6 hetoerodimera, čime se proširuje spektar mogućih liganada. TLR4 receptori odgovorni su za prepoznavanje gram-negativnih bakterija vezanjem lipopolisaharida (LPS, *engl*. lipopolysaccharide), *S. Pneumoniae* vezanjem pneumolizina te respiracijskog sincicijskog virusa (RSV, *engl*. respiratory syncytial virus) vezanjem određenih proteina (Chen i sur., 2007). Od DAMP molekula, pretpostavlja se da TLR2 i TLR4 mogu prepoznati proteine toplinskog šoka Hsp60 i Hsp70 (HSP, *engl*. heat shock protein), oslobođene iz stanica pasivnim (nekroza) ili aktivnim putem, a koji vezanjem za receptore induciraju stvaranje upalnih citokina što može doprinjeti patogenezi KOPB-a razvojem sterilne upale (Mollen i sur., 2006; Tsan i Gao, 2004). Osim njih, prepoznaju i brojne druge molekule: ROS, koji su agonisti TLR2 receptora (Mitchell i sur., 2010), proteine oslobođene iz mrtvih ili umirućih stanica te fragmente nastale kidanjem molekula izvanstaničnog matriksa (Chen i sur., 2007).

1.3.3. Signalni put TLR receptora

Nakon vezanja liganda za izvanstaničnu domenu, TLR receptori dimeriziraju i aktiviraju unutarstanične signalne molekule. TLR receptori na ovaj način neizravno aktiviraju različite transkripcijske čimbenike, ovisno o adaptacijskoj molekuli koja sudjeluje u tom procesu i koja se povezuje s TLR receptorom preko svoje TIR domene. Četiri različite adaptacijske molekule mogu sudjelovati u signalizaciji koju potiču TLR receptori: čimbenik mijeloidne diferencijacije (MyD88, *engl*. myeloid differentiation factor 88), koji također posreduje i u signalizaciji receptora za IL-1 (IL-1R, *engl*. interleukin-1 receptor), adaptacijski protein sličan MyD88/adaptacijski protein s TIR domenom (Mal/TIRAP, *engl*. MyD88 adaptor-like/TIR adaptor protein), adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (TRIF, *engl*. TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β) i adaptacijski protein srodan TRIF-u (TRAM, *engl*.TRIF-related adaptor molecule*)*. Peta adaptacijska molekula, protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (SARM, *engl*. Sterile-alpha and Armadillo motif containing protein), odgovorna je za negativnu regulaciju signalnog puta ovisnog o TRIF-u.

Svi do sada otkiveni TLR receptori, osim TLR3, nakon aktivacije koriste put ovisan o MyD88 adaptacijskoj molekuli koji dovodi do aktivacije NF-κB i proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, *engl*. mitogen-activated protein kinase) signalnih putova. TLR3 koristi put neovisan o MyD88 (preko TRIF-a), a TLR4 oba puta, put ovisan i neovisan o MyD88 (Bezemer i sur., 2012; Lafferty i sur., 2010; Optiz i sur., 2010; Sarir i sur., 2008).

U putu ovisnom o MyD88, MyD88 se povezuje se s TIR domeom TLR receptora preko svoje TIR domene što dovodi do fosforilacije i aktivacije kinaza povezanih s receptorom za IL-1 (IRAK, *engl*. IL-1R associated kinases), ponajprije IRAK4, a zatim IRAK1. Za kompleks IRAK1/IRAK4 veže se čimbenik 6 povezan s TNF receptorom (TRAF6, *engl.* TNF-receptor-associated factor 6). To uzrokuje aktivaciju dvaju kinaza: kinaze koju aktivira transformirajući faktor rasta β (TAK1, *engl*. transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase) i kinaze 6 MAPK (MKK6, *engl*. mitogen-activated protein kinase kinase 6).

Aktivirani TAK1 dovodi do fosforilacije inhibicijskog proteina kappa B (I-κB, *engl*. inhibitory kappa B). I-κB tada se otpušta iz kompleksa s NF-κB i degradira se putem proteasoma. NF-κB se pri tome aktivira i translocira u jezgru gdje djeluje kao transkripcijski čimbenik i vezanjem za DNA potiče transkripciju gena za brojne antimikrobne proteine i upalne medijatore (IL-1β, IL-6 i TNF-α) (Optiz, 2010; Sarir i sur., 2010; Liew i sur., 2005).

MKK6 fosforilira MAPK te ih na taj način aktivira. Do sada je u sisavaca opisano 5 različitih skupina MAPK, od kojih su najvažnije kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1 i 2 (ERK

1/2, *engl.* extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), kinaze koje fosforiliraju N-kraj c-Jun-a (JNK, *engl*. c-Jun N-terminal kinases) i p38 kinaze. ERK1/2 se aktiviraju putem čimbenika rasta i povezuju se uglavnom s preživljavanjem stanice, proliferacijom i diferencijacijom. Aktivirani ERK1/2 fosforilira brojne transkipcijske čimbenike, primjerice c-fos i aktivacijski protein 1 (AP-1, *engl*. activator protein 1), koji potiču tanskipciju gena važnih za preživljavanje stanice. JNK i p38 kinaze se aktiviraju kao odgovor na stresne podražaje, poput osmotskog šoka, ionizirajućeg zračenja, oksidansa i citokina te su uglavnom odgovorni za poticanje upale i apoptoze. Aktivirane JNK i p38 kinaze fosforiliraju brojne transkipcijske čimbenike (c-Jun, NF-κB) koji vezanjem za DNA dovode do sinteze upalnih citokina i apoptoznih molekula (Sarir i sur., 2008; Lu i Xi, 2006; Roux i Blenis, 2004).

1.3.4. Uloga TLR receptora u KOPB-u

Aktivacija TLR receptora ključna je za izazivanje odgovora urođenog i pojačavanje odgovora stečenog imuniteta koji sudjeluju u borbi protiv mikroorganizama. Međutim, članovi porodice TLR receptora uključeni su i u patogenezu autoimunih i infektivnih bolesti te kronične upale (Liew i sur., 2005). Sve veći broj dokaza upućuje na to da oslabljeli urođeni imunitet pridonosi patogenezi KOPB-a, budući da je uloga TLR receptora održavanje homeostaze u plućima (Lafferty i sur., 2010). Pretpostavlja se da se bolest razvija kao posljedica pretjerane aktivacije ili smanjene inhibicije TLR receptora (Liew i sur., 2005). Osim toga, identificirani su brojni polimorfizmi u genima za TLR receptore. Genetske varijante humanih TLR2 i TLR4 receptora povezane su s promjenjivom osjetljivošću na infekcije izazvane mikobakterijama, RSV-om ili legionelom (Optiz i sur., 2010).

KOPB i pušenje djeluju na ekspresiju TLR receptora i na signalne putove koje oni potiču. Istraživanja su pokazala da upala koju izazivaju oksidansi iz ekstrakta cigaretnog dima (CSE, *engl*. cigarette smoke extract) nije prisutna u „knockout“ životinja za TLR2 i TLR4 te da TLR2 najvjerojatnije sudjeluje u ranoj fazi upale koju izazivaju oksidansi, dok bi TLR4 mogao biti uključen u kasnijoj fazi (Mitchell i sur., 2010).

Akutno izlaganje CS-u dovodi do aktivacije TLR4 receptora u ljudi, bilo izravnim vezanjem komponenata CS-a za receptore ili neizravno, oštećenjem epitelnih stanica i oslobađanjem DAMP molekula koje onda prepoznaju TLR receptori (Optiz, 2010). CS sadrži LPS, poznati agonist TLR4 receptora, ali i bakterije koje bi mogle biti izvor LPS-a, što objašnjava način izravne aktivacije receptora (Bezemer i sur., 2012).

Otkriveno je da je ekspresija TLR4 receptora u nazalnom epitelu pušača i bolesnika s KOPB-om snižena te da CSE ovisno o dozi smanjuje ekspresiju tih receptora na stanicama ljudske epitelne stanične linije (Sarir i sur., 2008).
Nedavno se pokazalo da i TLR2 ima ulogu u KOPB-u, iako su rezultati različitih istraživanja nedoslijedni. Ekspresija TLR2 povišena je u monocitima iz periferne krvi bolesnika s KOPB-om u odnosu na nepušače i pušače s normalnom funkcijom pluća, a snižena je u neutrofilima dobivenim iz ispljuvka pušača s KOPB-om u odnosu na zdrave pušače (von Scheele i sur., 2011; Pons i sur., 2006). U alveolarnim makrofagima bolesnika s KOPB-om i zdravih pušača opažena je snižena ekspresija TLR2 (Droemann i sur., 2005), dok se ekspresija TLR4 u makrofagima, monicitima i neutrofilima nije značajno razlikovala među ispitivanim skupinama (von Scheele i sur., 2011; Pons i sur., 2006; Droemann i sur., 2005).

Smanjeno djelovanje TLR receptora može značajno doprinijeti egzacerbacijama KOPB-a zbog kompromitirane osjetljivosti na bakterije ili viruse te zbog smanjene sposobnosti fagocitiranja bakterijskih i apoptoznih stanica. S druge strane, povećana aktivacija TLR receptora može uzrokovati neprimjereno pojačanu upalu, što dovodi do oštećenja tkiva (Bezemer et al., 2012).

1.3.5. Djelovanje LTA i LPS-a na TLR2 i TLR4 receptore

LTA i LPS vezanjem za TLR receptore uzokuju sličan tip upalnog odgovora. LPS inducira brojne upalne i vazoaktivne gene, uključujući gene za sintazu II dušikovog oksida (NOS II, *engl.* nitric oxide synthase II), COX2, endotelin-1, TNF-α i druge citokine. Djelovanje LPS-a značajno se pojačava u prisustvu seruma budući da su za njegovo prepoznavanje i prezentiranje TLR4 receptoru bitni protein koji veže LPS (LPB, *engl.* LPS-binding protein) i CD14 koje nalazimo upravo u serumu. Bakterijski LPS izoliran iz stanične stijenke gram-negativnih bakterija često je korišten u istraživanjima procesa upale budući da oponaša upalna djelovanja citokina, naručito TNF-α, IL-1β i IL-6. Međutim, ima nekoliko prednosti u odnosu na citokine: jeftin je, djelovanje ne ovisi o vrsti i uzrokuje snažniji odgovor od pojedinačnog citokina. Vezanje LPS-a za TLR4 receptor uzokuje aktivaciju puta ovisnog o MyD88 i puta neovisnog o MyD88 preko TRIF adaptacijske molekule. Na jednak način na koji CD14 omogućava prezentiranje LPS-a TLR4 receptoru, CD36 omogućava vezanje LTA porijeklom iz gram-pozitivnih bakterija za kompleks TLR2/TLR6 te dovodi do aktivacije puta ovisnog o MyD88 (Mitchell i sur., 2007).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

TLR receptori uključeni su u regulaciju urođenog i stečenog imuniteta te imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze pluća. Važni su u obrani od patogena, ali ne dozvoljavaju razvijanje pretjeranog upalnog odgovora koji bi mogao dovesti do oštećenja plućnog tkiva.
Jedna od glavnih karakteristika KOPB-a je kronična upala. Smatra se da cigaretni dim i drugi štetni okolišni čimbenici, u kombinaciji s genskom predispozicijom, djeluju na TLR receptore, dovode do njihove aktivacije, nakupljanja stanica imunosnog sustava u većem broju u dišnim putovima, otpuštanja upalnih citokina te promjena u ekspresiji gena za TLR receptore što pridonosi razvoju kronične upale. Također, kod bolesnika s KOPB-om česta je kronična kolonizacija dišnih putova bakterijama što u kombinaciji sa smanjenom sposobnošću fagocitoze patogena i smanjenom aktivacijom TLR receptora može dovesti do egzacerbacija.

LPS (agonist TLR4) i LTA (agonist TLR2) aktivacijom TLR receptora uzrokuju sličan upalni odgovor, a LPS se već dugi niz godina koristi u istraživanjima procesa upale.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati citotoksičnost LPS-a i LTA. NCI-H292, epitelne stanice traheo-bronhijalnog trakta, tretirali smo različitim koncentracijama agonista TLR receptora (0,1 μg/mL, 0,5 μg/mL, 1 μg/mL i 5 μg/mL). Vijabilnost stanica ispitivala se na 3 načina: određivanjem katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH), MTS testom i tripanskim plavilom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kultura stanica

NCI-H292 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) su stanice mukoepidermoidnog plućnog karcinoma originalno izolirane iz metastaze u limfnom čvoru 32-godišnje bolesnice. Stanice su epitelnog tipa te adheriraju na podlogu (www.lgcstandards-atcc.org). Konstitutivno eksprimiraju mRNA za TLR1 - 10 (Hou i sur., 2006).

Stanice su uzgajane u bocama za uzgoj staničnih kultura (25 cm^2 ili 75 cm^2) s odgovarajućim volumenom kompletnog RPMI medija (6 ili 15 mL) u inkubatoru (Hera Cell, Kendro Laboratory Products, Njemačka) na 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Kompletni RPMI medij sadrži RPMI-1640 s L-glutaminom (Lonza Group Ltd, Švicarska) kojem su dodani 7 mM glukoza (Kemika), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich Co., USA), 0,6 mM piruvat (Fluka, Švicarska), 10 % fetalnog goveđeg seruma (inaktiviran toplinom;FBS, *engl*. fetal bovine serum) (South American Origin, Biosera, USA) i 1 % 100x koncentrirane otopine antibiotika i antimikotika (10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina, 25 μg/mL amfotericina B) (Lonza Group Ltd, Švicarska). Stanice su kultivirane do 80–90 % konfluentnosti što je kontrolirano invertnim mikroskopom (Diavert, Leitz, Njemačka). Nakon postizanja tražene konfluentnosti, stanice su presađene ili tretirane određenim agensima.

3.1.1. Presađivanje stanica

Prilikom kultivacije, stanice su presađivane najčešće 3 puta tjedno. Kompletni RPMI medij iznad adherentnih stanica ukloni se vakuum sisaljkom. Stanice se isperu 2 puta s 1 ili 5 mL 0,38 mg/mL otopine EDTA (Sigma-Aldrich Co., USA) ovisno o veličini boce za uzgoj stanica kako bi se uklonili ostaci seruma koji sadrži α_1-antitripsin koji bi mogao inhibirati djelovanje tripsina u sljedećem koraku. Otopina EDTA se odsiše vakuum sisaljkom i doda se 1 ili 3 mL 0,25 %-tne otopine Tripsin - EDTA (Sigma-Aldrich Co., USA) kako bi se stanice odvojile od podloge. Nakon 5 minuta inkubacije na 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2, na stanice se doda 3 ili 5 mL kompletnog RPMI medija koji zaustavlja djelovanje tripsina te se stanice resuspendiraju pipetom. Stanična suspenzija se prenese u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira (Biofuge Stratos Heraeus, Kendro Laboratory Products, Njemačka) 5 minuta na 200 g pri sobnoj temperaturi. Nadsloj se ukloni vakuum sisaljkom, a talog stanica resuspendira u 1 mL kompletnog RPMI medija. Najprije se odredi broj stanica u suspenziji, a onda se određeni volumen suspenzije stanica nasadi u novu bocu za uzgoj staničnih kultura u koju je prethodno stavljen određeni volumen kompletnog RPMI medija. Ukoliko se stanice broje

razrjeđuju se dodatkom medija i rasađuju u odgovarajuće boce tako da bude 2–3 x 10^4 stanica/cm^2. Brojanje stanica nije uvijek nužno i ukoliko se stanice ne broje rasađivanje se može vršiti i razrjeđivanjem stanica medijem u omjeru 1:3 - 1:8, ovisno o potrebnom broju stanica i korištenoj boci za uzgoj stanica. Boca se nakon presađivanja spremi u inkubator na 37°C, pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

3.1.2. Tretiranje stanica

Stanice se nasade na ploče u određenom broju i volumenu. Inkubiraju se 24 sata na 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2, nakon čega se tretiraju s 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL i 5 µg/mL LPS-a (Sigma-Aldrich Co., USA) te s 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL i 5 µg/mL LTA (InvivoGen, Francuska) tijekom 24 sata. Kontrola su netretirane stanice.

3.2. Priprema staničnih lizata

Nakon tretiranja stanica ploča sa 6 jažica stavi se na led te se medij iznad stanica premjesti u epruvete od 1,5 mL koje se centrifugiraju 10 minuta na 1500 g na +4°C. Nakon centrifugiranja odvoji se nadsloj u nove epruvete za određivanje katalitičke aktivnosti LDH u mediju iznad stanica. Adherirane stanice u jažicama isperu se s 1 mL ledeno hladnog PBS-a, nakon čega se PBS ukloni vakuum sisaljkom. PBS se priprema otapanjem 137 mM NaCl-a (Sigma-Aldrich Co., USA), 2,7 mM KCl-a (Sigma-Aldrich Co., USA), 4,3 mM Na_2HPO_4 x 7 H_2O (Kemika) i 1,4, mM KH_2PO4 (Kemika) u ultračistoj vodi, nakon čega se dodaje HCl (Kemika) dok se ne postigne pH 7,4.

U svaku jažicu doda se 600 µL ledeno hladnog pufera za lizu stanica (50 mM Tris HCl pH 8,0 (Sigma-Aldrich Co., USA), 137 mM NaCl (Sigma-Aldrich Co., USA), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., USA), 10% glicerol (Kemika), 100 mM Na-ortovanadat (Sigma-Aldrich Co., USA) i 36 µL/mL H_2O_2 (Alkaloid, Skopje)) uz dodatak ihnibitora proteaza (Complete Protease Inhibitor Coctail tablets, Roche Diagnostics, Švicarska) i ostavi 20 minuta da stoji na ledu. Zatim se stanice odvoje od podloge blagim struganjem silikonskim strugačem, a sadržaj svake jažice premjesti se u epruvetu od 1,5 mL. Ukoliko se smatra potrebnim, stanice se mogu dodatno lizirati soniciranjem upotrebom ultrazvučnog homogenizatora serije 4710 (Cole-Palmer Instrument Co.) na 4 W dva puta po 15 sekundi. Nakon toga se uzorci centrifugiraju 20 minuta na 15000 g pri +4°C. Nadsloj se odvoji i premjesti u nove epruvete za određivanje katalitičke aktivnosti LDH u staničnom lizatu.

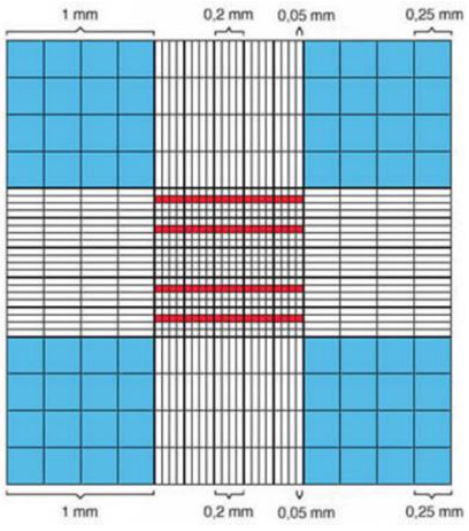
3.3. Test vijabilnosti i brojanje stanica tripanskim plavilom

Tijekom presađivanja stanica određuje se njihov broj i vijabilnost (udio živih stanica u ukupnom broju stanica (žive i mrtve stanice)) tako da se pomiješa 40 µL 0,4 %-tne boje tripansko plavilo (Lonza Group Ltd, Švicarska) i 10 µL suspenzije stanica. Međutim omjer tripanskog plavila i suspenzije stanica može se mijenjati ovisno o gustoći stanica, a najbolje je da bude oko 20-40 stanica po kvadratu Neubauerove komorice. Moguća su stoga različita razrjeđenja pri čemu korišteno razrjeđenje treba uvrstiti u formulu za izračun broja stanica. Ova metoda temelji se na principu da žive stanice imaju intaktne stanične membrane te stoga ne propuštaju boju tripansko plavilo u stanicu (molekule tripanskog plavila su velike i polarne), dok mrtve stanice propuštaju boju unutar stanice (molekule tripanskog plavila se u stanici vežu na citoplazmatske proteine). Dakle, žive stanice ostaju neobojene, a mrtve se oboje plavo. Kod brojanja stanica za presađivanje na Neubauerovu komoricu se nanese 10 µl mješavine tripanskog plavila i suspenzije stanica te se neobojene stanice izbroje pod invertnim mikroskopom (povećanje 400x) (slika 3.1.).

Formula za izračun broja stanica:

broj stanica u mL = srednja vrijednost broja stanica u 4 plava kvadrata × razrjeđenje / 0,0001,

pri čemu je 0,0001 volumen jednog kvadrata komore izražen u mililitrima.



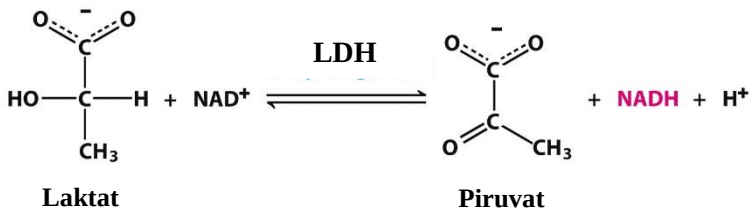
Slika 3.1. Neubauerova komorica. Stanice se broje u 4 velika kvadata (plavi kvadrati). Ukoliko su stanice na rubu kvadrata, broje se lijevi i gornji rub, uvijek isto za sve kvadrate.

Kod određivanja vijabilnosti stanica, posebno se zbroje žive i mrtve stanice. Vijabilnost se izražava kao broj živih stanica podijeljen s ukupnim brojem stanica:

vijabilnost (%) = [žive stanice / (žive + mrtve stanice)] × 100.

3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH

Određivanje katalitičke aktivnosti LDH služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari te se koristi kao pokazatelj integriteta stanične membrane. LDH je isključivo citoplazmatski enzim i ne bi smio biti prisutan u staničnom okolišu (mediju) ukoliko je integritet stanične membrane očuvan. Princip metode prikazan je na slici 3.2.



Slika 3.2. L-laktat se oksidira u piruvat u prisutnosti LDH, pri čemu se NAD^+ reducira te se mjeri porast apsorbancije NADH na 340 nm na 37°C prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi (slika preuzeta od Berg, 2012).

Katalitička aktivnost LDH odredi se na poluautomatskom biokemijskom analizatoru Trace 30 (Trace Scientific Ltd, Australija). Mjeri se apsorbancija kompletnog RPMI medija (slijepa proba), medija iznad netretiranih (kontrola) i medija iznad tretiranih stanica te staničnih lizata ne tretiranih (kontrola) i tretiranih stanica nakon dodatka reagensa za određivanje LDH (Dijagnostika d.o.o.) u omjeru 1:30 (20 µL uzorka + 600 µL reagensa). Uzorke staničnih lizata potrebno je razrijediti fiziološkom otopinom tako da izmjerena apsorbancija ostane u linearnom području mjerenja uređaja (20-1000 U/L).

Katalitička aktivnost LDH izračuna se množenjem faktora s dobivenom razlikom apsorbancija u jednoj minuti. Faktor se računa na sljedeći način:
faktor = (TV x 1000) / (SV x ε x P),
pri čemu je TV ukupni volumen reakcijske smjese (µL), SV je volumen uzorka (µL), ε milimolarni koeficijent apsorbancije NADH na 340 nm (6,3 L/mmol) i P je debljina kivete (cm). Pri našim uvjetima izračunat faktor je iznosio 4921.

Udio LDH koja se izluči u stanični medij se izračuna na sljedeći način:

Udio LDH izlučene u medij (%) =

$$\left[\frac{\text{katalitička aktivnost LDH u mediju iznad stanica (U/L)}}{\text{(kat. akt. LDH u mediju iznad stanica(U/L) + kat. akt. LDH u staničnom lizatu (U / L) x V)}}\right],$$

pri čemu V označava volumen staničnog lizata (0,6 mL).

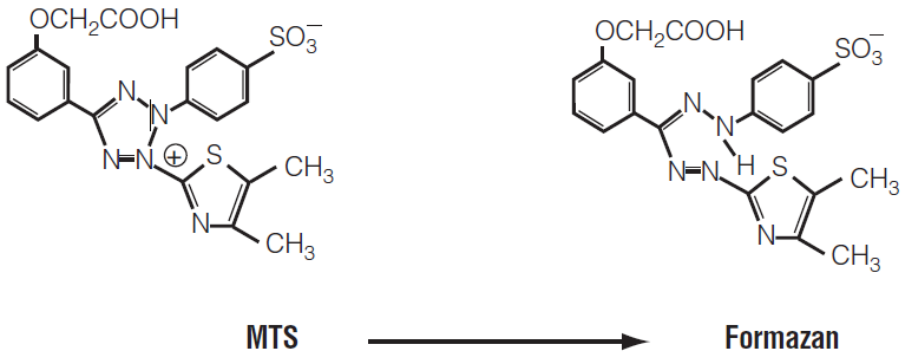
Rezultati se prikažu grafički kao srednja vrijednosti ± standardna pogreška na 3 načina:

1. kao udio (%) katalitičke aktivnosti LDH izlučene u medij (U/L) u odnosu na ukupnu katalitičku aktivnost LDH u stanicama (U/L),
2. kao katalitička aktivnost LDH izlučena u medij (U/L),
3. kao vijabilnost, pri čemu se srednja vrijednost katalitičke aktivnosti LDH (U/L) u mediju netretiranih kontrolnih stanica uzima da iznosi 100 % i prema njoj se uspoređuju uzorci tretiranih stanica.

3.5. MTS test

MTS test služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u obojeni formazanski produkt (slika 3.3.).

Nakon tretiranja stanica, u svaku jažicu se dodaje 20 µL MTS reagensa (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Wisconsin, USA) bez prethodnog uklanjanja medija i stanice se inkubiraju tijekom 4 sata na 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Slijepa proba je kompletni RPMI medij. Apsorbancija se mjeri na 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR3 Multilabel Reader, PerkinElmer, Massachusetts, USA). Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica proglasi se 100 %, a vrijednosti apsorbancija tretiranih uzoraka izraze se kao udio u odnosu na netretirane stanice. Rezultati se prikažu grafički kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica ± standardna pogreška.



Slika 3.3. Prikaz redukcije MTS-a u formazan. Odvija se u metabolički aktivnim stanicama uz pomoć NADPH ili NADH koje stvaraju dehidrogenaze. Intenzitet boje nastao redukcijom MTS-a proporcionalan je broju živih stanica i određuje se spektrofotometrijski. (slika preuzeta sa www.promega.com).

3.6. Statistička obrada rezultata

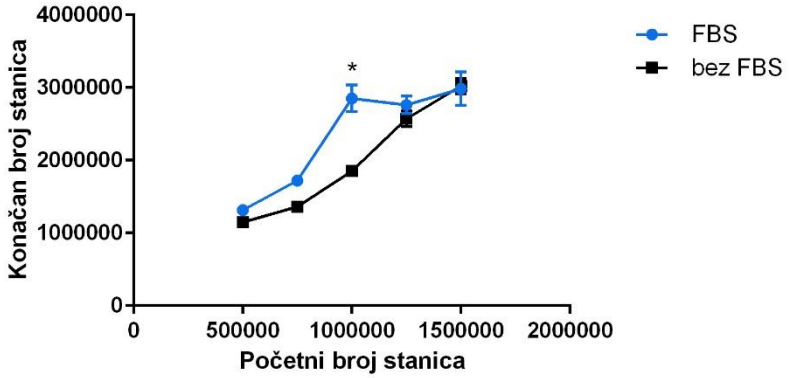
Dobiveni rezultati pokusa analizirani su upotrebom programa SigmaStat verzija 3.0 (SPSS Inc.) ili Prism verzija 6.05 (GraphPad Software Inc.) za Windows-e. Statističke razlike između skupina testirane su parametrijskim testovima: testom za usporedbu dvije skupine podataka (t-test) i testom za usporedbu više od dvije skupine podataka – testom jednosmjerne analize varijanci (ANOVA, *engl*. One Way Analysis of Variance) i Dunnetovim ili Dunnovim testom značajnosti za post hoc analizu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednosti ± standardna pogreška. Za statistički značajne razlike uzeta je vrijednosti $P<0,05$, gdje P označava koeficijent povezanosti dvije nekontinuirane varijable.

4. REZULTATI I RASPRAVA

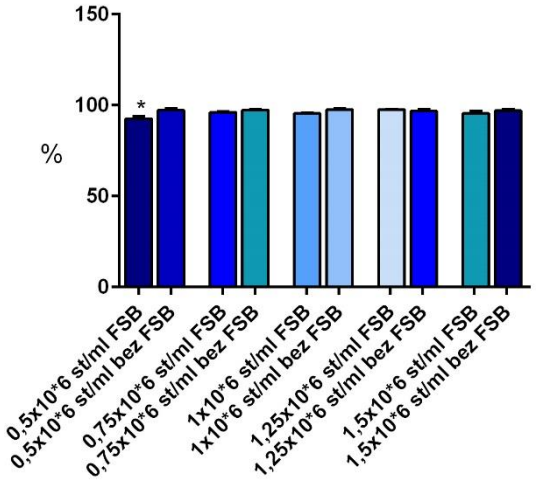
4.1. Određivanje optimalnog broja stanica i uvjeta kultiviranja za LDH test

Kako bi se odredio optimalan broj stanica i uvjeti kultiviranja za LDH test na ploče sa 6 jažica nasadi se različiti broj NCI-H292 stanica: 0,5 x 10^6, 0,75 x 10^6, 1 x 10^6, 1,25 x 10^6 i 1,5 x 10^6. Stanice se inkubiraju 24 sata u RPMI mediju sa serumom na 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Nakon toga se medij odsiše i u svaku jažicu se doda 1 mL medija sa serumom ili medija bez seruma. U takvim uvjetima stanice se kultiviraju tijekom 24 sata. Stanice se zatim izbroje pod invertnim mikroskopom na Neubauerovoj komorici uz dodatak tripanskog plavila te se odredi njihova vijabilnost. Rezultati se prikažu grafički kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Na grafičkom prikazu (slika 4.1.) vidi se da je rast stanica veći u mediju s 10 % FBS-a, a najveća razlika u rastu stanica bila je kada je nasađeno 1 x 10^6 stanica. Naime, u mediju sa serumom naraslo je gotovo 3 puta više stanica nego što ih je nasađeno ($2,85x10^6 \pm 0,18x10^6$) u odnosu na stanice koje su rasle u mediju bez seruma ($1,85x10^6 \pm 0,06x10^4$), $P<0,05$. Na slici 4.2. može se vidjeti da je vijabilnost stanica bila uvijek veća od 90 % neovisno o prisutnosti FBS-a i broja nasađenih stanica. Rezultati su pokazali veću vijabilnost stanica u mediju bez seruma u odnosu na medij sa serumom jedino kada ih je bilo nasađeno 0,5 x 10^6 stanica/mL medija, $P<0,05$ (slika 4.2.).



Slika 4.1. Ovisnost konačnog broja nasađenih NCI-H292 stanica o početnom broju stanica nakon 24 h kultiviranja u mediju s 10 % FBS-a i bez seruma. Broj stanica određen je tripanskim plavilom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=4. Značajnom razlikom u porastu broja stanica u mediju sa serumom u odnosu na medij bez seruma se smatrala vrijednost $P<0,05$(*).



Slika 4.2. Vijabilnost NCI-H292 stanica nasađenih u različitom broju i kultiviranih 24 h u mediju s 10 % FBS-om i bez seruma određena tripanskim plavilom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti ± standardna pogreška, n=4. Uspoređivale su se vijabilnosti stanica nasađenih u jednakom broju u mediju sa serumom u odnosu na one u mediju bez seruma, a značajnom razlikom u vijabilnosti smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).

Ovo preliminarno ispitivanje služilo je kako bi se odredilo u kojem broju je najoptimalnije nasađivati stanice na ploče sa 6 jažica te da li će se prilikom kultivacije koristit medij s ili bez dodatka seruma. Prva 24 h nakon nasađivanja na ploču stanice su bile uzgajane u kompletnom RPMI mediju (sadrži 10 % FBS-a) i sve su jednako rasle. Sljedeća 24 sata dio stanica je uzgajan u mediju sa serumom, a dio u mediju bez seruma. Stanice u kompletnom RPMI mediju nastavile su normalo rasti sve do postizanja maksimalne konfluentnosti (kada je bilo približno 3 x 10^6 stanica), dok su one bez seruma sporije rasle. To se slaže s preporukom ATCC-a za uzgoj NCI-H292 stanica u RPMI mediju uz dodatak 10 % FBS-a (www.lgcstandards-atcc.org). Temeljem ovog ispitivanja odlučili smo da ćemo za daljnje pokuse nasađivati 1 x 10^6 stanica u 1 mL medija sa serumom budući da su stanice pokazale značajno bolji rast u mediju sa serumom nego u mediju bez seruma.

4.2. Utjecaj načina pripreme staničnih lizata na katalitičku aktivnost LDH

Ispitivalo se kako će priprema staničnih lizata (uz dodatno soniciranje ili bez njega) utjecati na katalitičku aktivnost laktat dehidrogenaze lizata NCI-H292 stanica. Stanice su nasađene na ploče sa 6 jažica tako da ih je bilo 1 x 10^6 u 1 mL kompletnog RPMI medija i inkubirane su 24 sata. Nakon toga su se pripremili stanični lizati na dva načina: uz dodatno soniciranje upotrebom ultrazvučnog homogenizatora ili bez dodatnog soniciranja te se određivala katalitička aktivnost LDH. Uspoređivale su se vrijednosti aktivnosti LDH lizata netretiranih stanica dobivenih bez i sa soniciranjem, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=6.
Vrijednosti katalitičke aktivnosti LDH nisu se značajno razlikovale u uzorcima staničnih lizata uz dodatno soniciranje (2862 ± 15 U/L) u donosu na lizate pripremljene bez soniciranja (2778 ± 104 U/L), P>0,05.

Ovim preliminarnim ispitivanjem određivalo se kakav utjecaj ima dodatno soniciranje na pripremu staničnih lizata kako bi se optimirali uvjeti ispitivanja vijabilnosti NCI-H292 stanica mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH. Pojedina istraživanja govore u prilog korištenju slabih detergenata u kombinaciji sa soniciranjem kako bi se skratilo vrijeme soniciranja (upotrebom digitonina potrebno je samo 3 sekunde soniciranja) te se na taj način smanji utjecaj povišenja temperature pod utjecajem ultrazvučnih valova (Brown i Audet, 2008). Ipak, naše ispitivanje je pokazalo da dodatno soniciranje nema značajnog utjecaja na katalitičku aktivnost LDH prilikom pripreme staničnih lizata, te se u daljnjim ispitivanjima koristio postupak bez soniciranja.

4.3. Utjecaj različitih temperatura, stajanja uzorka i inhibitora proteaza na aktivnost LDH NCI-H292 stanica

Ispitivala se aktivnost LDH u mediju iznad NCI-H292 stanica i u staničnom lizatu (pripremljenom s i bez inhibitora proteaza) pod različitim uvjetima stajanja uzorka: odmah, idući dan, nakon dva dana i nakon pet dana čuvanja uzorka na temperaturama +4 i -20°C.
Uspoređivale su se vrijednosti katalitičke aktivnosti LDH u mediju iznad stanica određivane 1. dana i nakon 2, 3 ili 5 dana čuvanja na istoj temperaturi te za jednako vrijeme čuvanja na različitim temperaturama. Utjecaj inhibitora proteaza na katalitičku aktivnost LDH ispitivao se usporedbom lizata pripremljenih s tabletom inhibitora proteaza i bez inhibitora proteaza nakon jednakog broja dana čuvanja i na istoj temperaturi. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=2.
Ispitivanje je pokazalo da se katalitička aktivnost LDH u mediju iznad stanica nije značajno promijenila nakon 2, 3 ili 5 dana čuvanja u odnosu na 1. dan, niti na +4°C niti na -20°C, $P>0,05$. Isto tako nema značajne razlike u aktivnosti LDH u mediju iznad stanica za jednak broj dana čuvanja na različitim temperaturama, $P>0,05$. Prema rezultatima, katalitička aktivnost LDH u lizatima pripremljenim uz dodatak tablete inhibitora značajno se snizila u uzorku mjerenom odmah nakon pripreme lizata i čuvanjem uzoraka na +4°C 2, 3 i 5 dana u odnosu na lizate pripremljene bez inhibitora proteaza, $P<0,05$. U uzorcima staničnih lizata čuvanih na -20°C tijekom 2, 3 i 5 dana nije bilo značajne promjene u aktivnosti LDH lizata pripremljenih s inhibitorom proteaza u odnosu na lizate pripremljene bez inhibitora proteaza, $P>0,05$ (tablica 4.1.).

+4°C				
	1. dan	**2. dan**	**3. dan**	**5. dan**
medij NT	25,0 ± 3,0	16,5 ± 1,5	22,5 ± 0,5	18,5 ± 0,5
lizat NT +IP	4730 ± 30	4680 ± 120	5210 ± 90	4760 ± 0
lizat NT bez IP	5250 ± 50	5900 ± 100	5520 ± 0	5800 ± 0
-20°C				
	1. dan	**2. dan**	**3. dan**	**5. dan**
medij NT	25,0 ± 3,0	16,5 ± 1,5	21,5 ± 0,5	21,0 ± 4,0
lizat NT +IP	4730 ± 30	5550 ± 870	4180 ± 200	4260 ± 0
lizat NT bez IP	5250 ± 50	4440 ± 0	4750 ± 10	4960 ± 0

Tablica 4.1. Izmjerena katalitička aktivnost LDH (U/L) medija iznad NCI-H292 stanica i staničnih lizata pripremljenih s i bez tablete inhibitora proteaza nakon 24 sata inkubacije u kompletnom RPMI mediju. IP = tableta inhibitora proteaza; NT = netretirane stanice. Aktivnost je određivana odmah (1. dan), nakon 2, 3 i 5 dana, a uzorci su se čuvali na +4°C i na -20°C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=2.

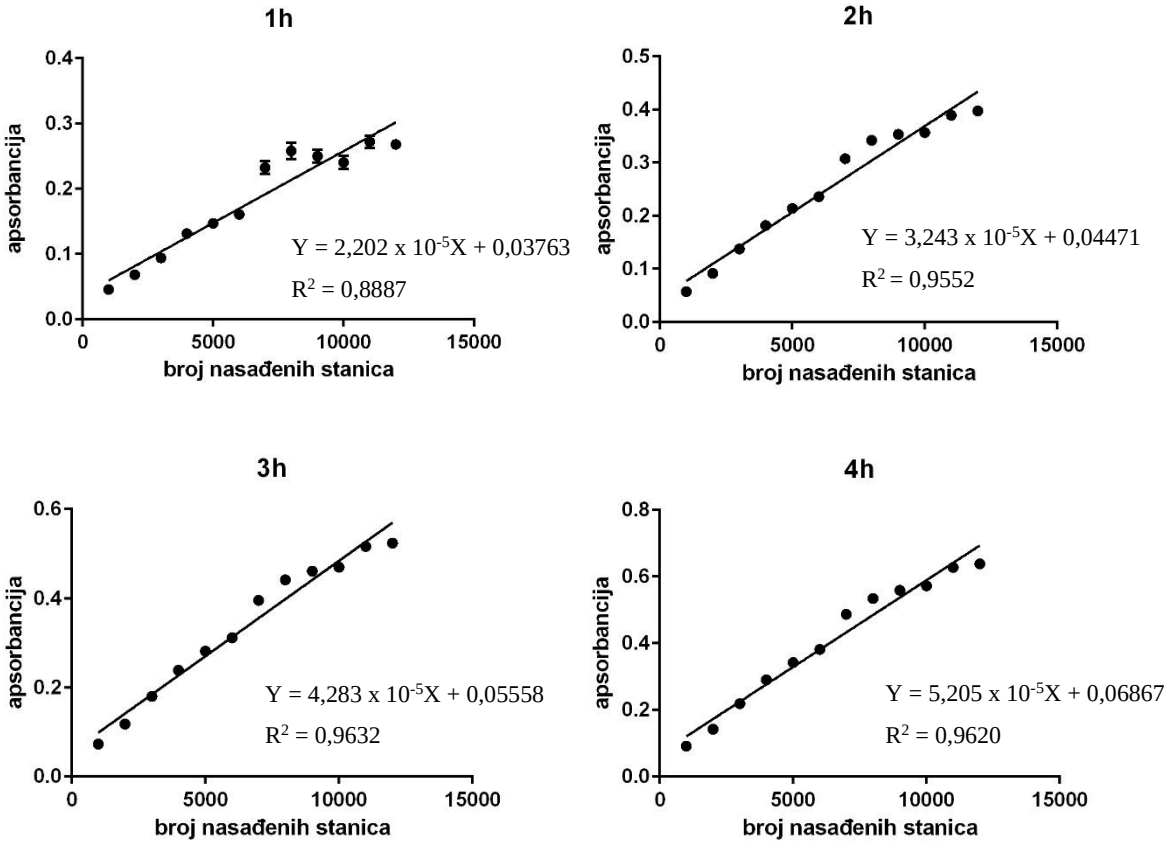
Ovim preliminarnim ispitivanjem određivao se utjecaj temperature, dužine vremena čuvanja uzoraka na određenoj temperaturi te dodatka tablete inhibitora proteaza (kod staničnih lizata) na katalitičku aktivnost LDH. Ispitivanje je pokazalo da nema razlike u aktivnosti LDH u mediju iznad stanica ukoliko se određivanje provodilo isti dan i nakon čuvanja uzorka dva, tri ili pet dana na +4°C ili -20°C. Ispitivanje je također pokazalo da inhibitor proteaza uzrokuje smanjenje katalitičke aktivnosti LDH određivane odmah nakon pripreme staničnih lizata i u uzorcima lizata čuvanih na +4°C, ali ne i onih čuvanih na -20°C. Temeljem rezultata dobivenih ovim ispitivanjem zaključeno je da LDH nije nužno određivati isti dan nakon pripreme staničnih lizata. Ipak, obzirom da se ovaj zaključak temelji na samo dva mjerenja po svakom navedenom uvjetu (n=2), rezultate bi trebalo provjeriti na većem broju uzoraka. Osim toga, stanični lizati pripremljeni na ovakav način koriste se i za neke druge analize za koje je važna prisutnost inhibitora proteaza te je stoga odlučeno da će se inhibitor proteaza dodavati u lizirajući pufer.

4.4. Određivanje optimalnog broja stanica i vremena inkubacije za MTS test

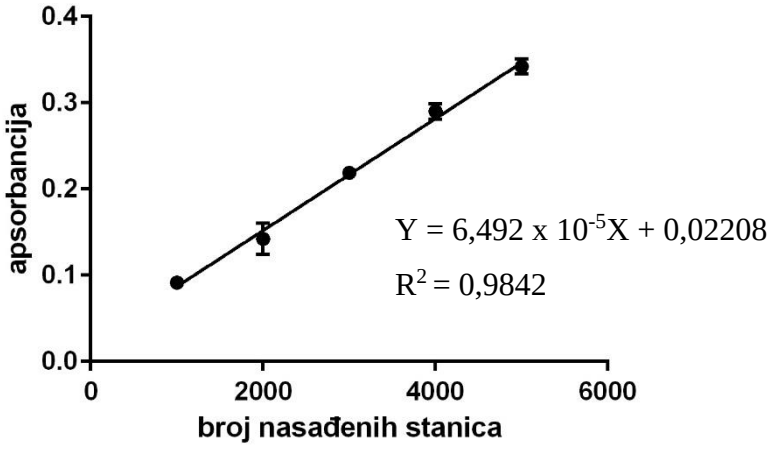
Kako bi se odredio optimalan broj stanica i vrijeme inkubacije za MTS test na ploče s 96 jažica nasadi se različit broj NCI-H292 stanica: od 1 x 10^3 do 12 x 10^3 stanica/mL RPMI medija sa serumom. Stanice se inkubiraju 24 sata na 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Nakon toga se medij odsiše i u svaku jažicu se doda 100 µL kompletnog medija te se stanice inkubiraju tijekom 24 sata. Nakon dodatka MTS reagensa inkubacija se provodi tijekom jednog, dva, tri i četiri sata. Slijepa proba je RPMI medij sa serumom. Rezultati se grafički prikažu kao ovisnost apsorbancije o broju nasađenih stanica.

Rezultati su pokazali vrlo visoku pozitivnu matematičku korelaciju uz razinu vjerojatnosti $P<0,0001$. Stanice inkubirane 1h nakon dodatka MTS reagensa pokazale su najmanju korelaciju ($R^2=0,8887$), one inkubirane 2h nešto veću ($R^2=0,9552$), zatim inkubirane 4h još veću ($R^2=0,9620$), dok su one inkubirane 3h pokazale najveću korelaciju ($R^2=0,9632$). Iz dobivenih jednadžbi pravaca vidjelo se da je nagib najveći nakon 4 h inkubacije (a=5,205 x 10^{-5}), te se smanjuje kako se vrijeme inkubacije skraćuje (a=4,283 x 10^{-5} za 3 h, a=3,243 x 10^{-5} za 2 h i a=2,202 x 10^{-5} za 1 h) (slika 4.3.).

Na slici 4.4. može se vidjeti da je linearno područje za stanice inkubirane 4 h nakon dodatka MTS reagensa između 1 x 10^3 i 5 x 10^3 nasađenih stanica po jažici ($R^2=0,9842$).



Slika 4.3. Ovisnost apsorbancije na 490 nm o broju nasađenih NCI-H292 stanica određena MTS testom nakon inkubacije 1, 2, 3 i 4 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=5.



Slika. 4.4. Ovisnost apsorbancije na 490 nm o broju nasađenih NCI-H292 stanica, za od 1 x 10^3 do 5 x 10^3 nasađenih stanica, određena MTS testom nakon inkubacije 4 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=5.

Ovim preliminarnim ispitivanjem određivalo se u kojem broju bi bilo najoptimalnije nasaditi stanice na ploče s 96 jažica te koliko dugo će se inkubirati stanice nakon dodatka MTS reagensa s obzirom na linearni odnos apsorbancije i broja nasađenih stanica. Budući da stanice inkubirane 4 sata i stanice inkubirane 3 sata nakon dodatka MTS reagensa imaju slične koeficijente korelacije uspoređivali smo njihove nagibe pravaca. Uočeno je da stanice inkubirane 4 h imaju najveći nagib pravca, odnosno za manju promjenu broja stanica imamo veću promjenu apsorbancije, te je odlučeno da će se stanice inkubirati upravo 4 sata nakon dodatka reagensa. Nakon toga smo odredili područje najveće linearnosti (R^2=0,9842) za stanice inkubirane 4 sata (slika 4.4.) koje se nalazi u području od 1 x 10^3 do 5 x 10^3 nasađenih stanica po jažici te smo odlučili da će se za MTS test nasađivati 5 x 10^3 stanica jer je pri toj vrijednosti apsorbancija dovoljno visoka. To se slaže s preporukom protokola korištenog MTS reagensa prema kojem se najoptimalniji rezultati dobivaju kada se u jažicu nasadi 5 x 10^3 stanica (vrijedi za većinu tumorskih stanica) iako se vijabilnost može odrediti i ako nasadimo manje stanica (minimalno 1 x 10^3) (www.promega.com).

4.5. Utjecaj LTA i LPS-a na vijabilnost NCI-H292 stanica

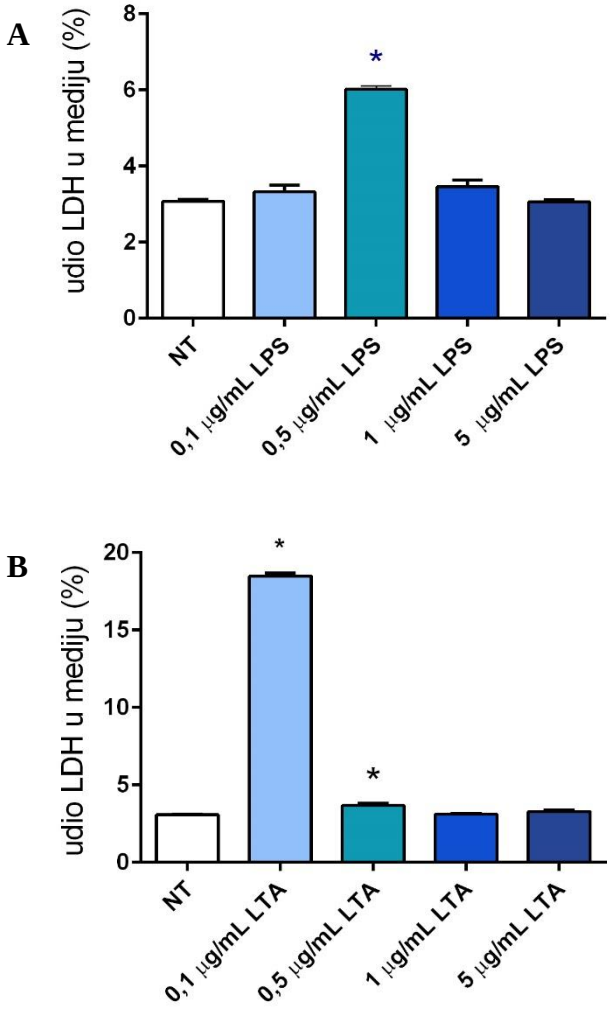
4.5.1. Određivanje vijabilnosti mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH

NCI-H292 stanice su se nasadile na ploče sa 6 jažica (1 mL medija s 1 x 10^6 stanica po jažici). Nakon 24 h kultivacije stanice su tretirane svježe pripremljenim LPS-om i LTA u različitim koncentracijama (0,1 μg/mL, 0,5 μg/mL, 1 μg/mL i 5 μg/mL) tijekom 24 h. Kontrola su bile netretirane stanice, inkubirane 24 h samo u mediju. Zatim su se pripremili stanični lizati te se odredila katalitička aktivnost LDH u mediju iznad stanica i u staničnim lizatima.

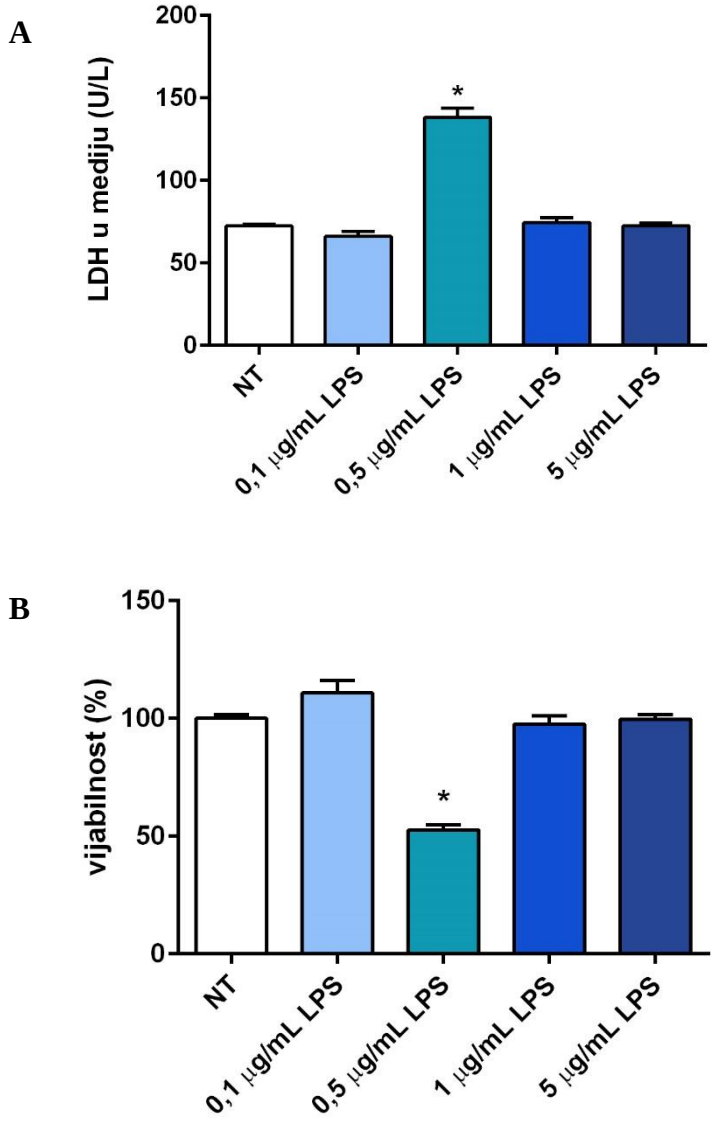
Rezultati određivanja udjela LDH izlučene u medij u odnosu na ukupnu LDH u stanicama pokazali su da 0,5 μg/mL LPS te 0,1 i 0,5 μg/mL LTA dovode do statistički značajnog porasta udjela LDH u mediju (6,018 ± 0,092 %, 18,487 ± 0,185 %, 3,672 ± 0,144 %) u odnosu na netretirane stanice (3,078 ± 0,051 %), ali 0,5 μg/mL LTA u statistički značajno manjoj mjeri u odnosu na 0,1 μg/mL LTA. 0,1, 1 i 5 μg/mL LPS-a te 1 i 5 μg/mL LTA ne uzrokuju promjenu udjela LDH u mediju u odnosu na netretirane stanice ($P>0,05$) (slika 4.5.).

Rezultati određivanja izlučene LDH u medij iznad stanica pokazali su da tretiranje stanica s 0,5 μg/mL LPS-a i s 0,1 μg/mL LTA uzrokuje statistički značajan porast izlučene LDH u medij u odnosu na netretirane stanice, dok je 1 μg/mL LTA uzrokovao značajno smanjenje izlučene LDH u medij u odnosu na netretirane stanice, $P<0,05$. 0,1, 1 i 5 μg/mL LPS-a, te 0,5 i 5 μg/mL LTA nisu uzrokovali promjenu izlučene LDH u medij u odnosu na netretirane stanice, $P>0,05$ (slike 4.6. A i 4.7. A).

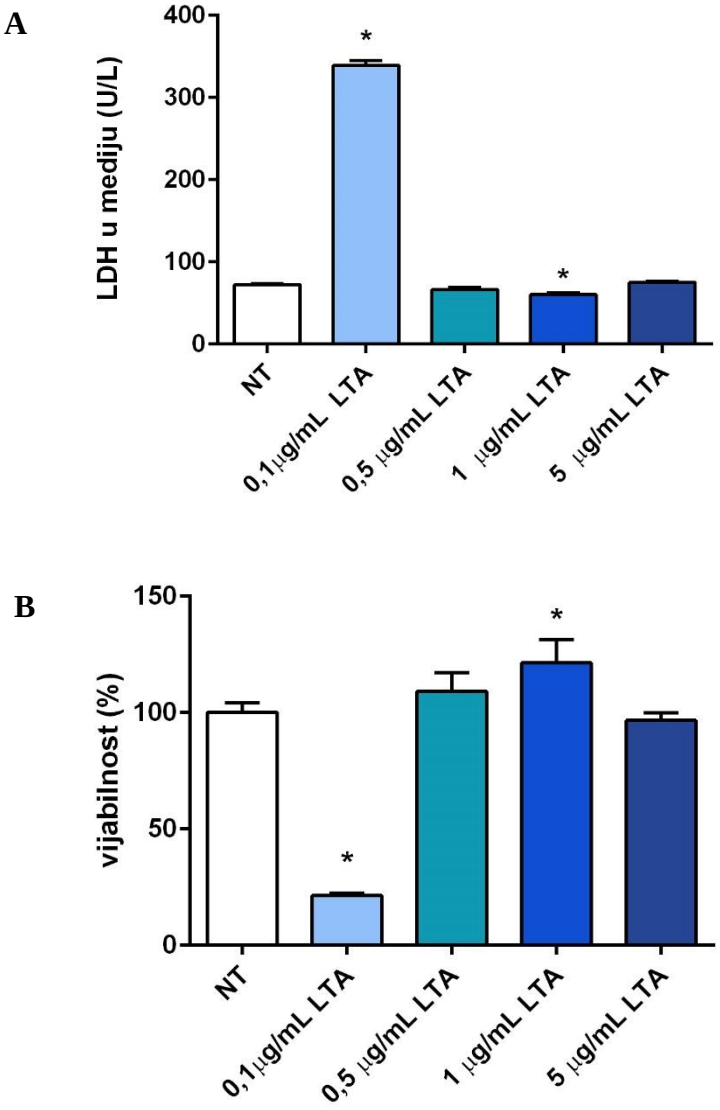
Rezultati određivanja vijabilnosti stanica pokazali su da tretiranje stanica s 0,5 μg/mL LPS-a i s 0,1 μg/mL LTA uzrokuje statistički značajan pad vijabilnosti (52,72 ± 2,12 %, 21,37 ± 0,40 %) u odnosu na netretirane stanice. 1 μg/mL LTA uzrokovao je značajan porast vijabilnosti stanica (121,3 ± 4,137 %) u odnosu na netretirane stanice, $P<0,05$ (slike 4.6. B i 4.7. B). 0,1, 1 i 5 μg/mL LPS-a, te 0,5 i 5 μg/mL LTA nisu uzrokovali promjenu vijabilnosti u odnosu na netretirane stanice, $P>0,05$.



Slika 4.5. Udio LDH izlučene u medij u odnosu na ukupnu LDH (LDH u mediju i staničnom lizatu) NCI-H292 stanica nakon 24 h tretiranja LPS-om (A) i LTA (B). NT su netretirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=6. Značajno različitom vijabilnosti u odnosu na netretirane stanice smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).



Slika 4.6. Izlučeni LDH u medij iznad NCI-H292 stanica (A) i vijabilnost stanica (B), nakon 24 h tretiranja LPS-om. Vijabilnost je izračunata prema udjelu izlučenog LDH u medij prema srednjoj vrijednosti kontrole (NT) za koju se uzelo da iznosi 100%. NT su netretirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=6. Značajnom razlikom izlučenog LDH i vijabilnosti u odnosu na netretirane stanice smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).

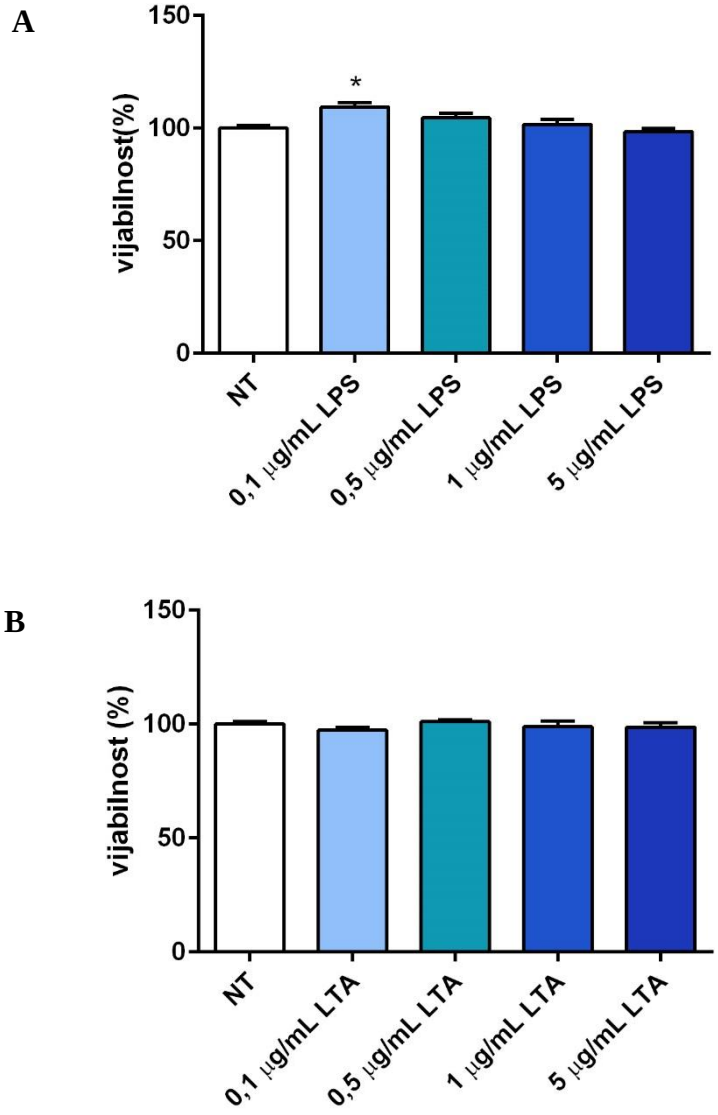


Slika 4.7. Izlučeni LDH u medij iznad NCI-H292 stanica (A) i vijabilnost stanica (B) nakon 24 h tretiranja LTA. Vijabilnost je izračunata prema udjelu izlučenog LDH u medij prema srednjoj vrijednosti kontrole (NT) za koju se uzelo da iznosi 100%. NT su netretirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=6. Značajnom razlikom izlučenog LDH i vijabilnosti u odnosu na netretirane stanice smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).

4.5.2. Određivanje vijabilnosti MTS testom

Stanice NCI-H292 nasađene su na ploče s 96 jažica (100 µL medija s 5 x 10^3 stanica po jažici) nakon čega su kultivirane 24 h. Nakon toga su stanice tretirane svježe pripremljenim LPS-om i LTA u različitim koncentracijama (0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL i 5 µg/mL) tijekom 24 h. Slijepa proba bio je medij sa serumom, a kontrola netretirane stanice.

Rezultati su pokazali da 0,1 µg/mL LPS-a uzrokuje značajno povišenje vijabilnosti NCI-H292 stanica (109,5 ± 1,812 %) u odnosu na kontrolu, $P<0,05$. Ostale koncentracije LPS-a (0,5 µg/mL, 1 µg/mL i 5 µg/mL) nisu uzokovale promjenu vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu, $P>0,05$. Niti jedna od korištenih koncentracije LTA (0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL i 5 µg/mL) nije uzrokovala promjenu vijabilnosti stanica u odnosu na kontrolu, $P>0,05$ (slika 4.8.).



Slika.4.8. Vijabilnost NCI-H292 stanica nakon tretiranja LPS-om (A) i LTA (B) određena MTS testom. Vijabilnost je izračunata prema srednjoj vrijednosti apsorbancija kontrole (NT) za koju se uzelo da iznosi 100 %. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti ± standardna pogreška, n=5. Uspoređivale su se vijabilnosti tretiranih uzoraka s kontrolom, a značajno različitom vijabilnost u odnosu na kontrolu smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).

U ovom ispitivanju korišteni su LPS i LTA, agonisti TLR4 i TLR2 receptora, koji vezanjem za receptore dovode do aktivacije NF-κB i MAPK signalnih putova te posljedično do upalnog odgovora, kojim se pokušala imitirati upala prisutna u bolesnika s KOPB-om. Djelovanje 4 različite koncentracije LPS-a i LTA (0,1, 0,5, 1 i 5 μg/mL) tijekom 24 h na NCI-H292 stanice ispitivalo se dvama testovima vijabilnosti: određivanjem katalitičke aktivnosti LDH i MTS testom. LDH je enzim koji se zbog svoje veličine (Mr=140 kDa) u zdravim stanicama nalazi isključivo u citoplazmi. Uslijed gubitka integriteta stanične membrane izlazi u stanični okoliš te se određivanjem katalitičke aktivnosti LDH u mediju iznad stanica može odrediti utjecaj različitih agenasa na integritet stanične membrane. MTS testom određuje se metabolička aktivnost, odnosno redukcijska sposobnost stanice (redukcija MTS-a u formazan).

Određivanjem udjela LDH u mediju iznad stanica u odnosu na ukupni LDH u stanicama pokazalo se da tretiranje NCI-H292 stanica s 0,5 μg/mL LPS-a tijekom 24 h sata dovodi do značajnog gubitka integriteta stanične membrane. Međutim, prema ispitivanju Koff-a i suradnika provedenom na istim stanicama, a u kojem se također određivao udio LDH izlučen u medij, pokazalo se da tek koncentracije ≥300 μg/mL uzrokuju gubitak integriteta stanične membrane. Isto ispitivanje je pokazalo da LPS u koncentracijama od 10 i 100 μg/mL ne utječe na integritet stanične membrane (Koff i sur., 2006). Sličnim ispitivanjem LDH provedenom na BEAS-2B epitelnim stanicama humanog bronhijalnog epitela tretiranih tijekom 24 h s 0,1, 1 i 10 μg/mL LPS-a pokazalo se da nema razlike u promjeni integriteta stanične membrane nakon tretiranja stanica (izraženo kao vijabilnosti) (Verspohl i Podlogar, 2012). To se slaže s našim ispitivanjem budući da je dobiveno da 0,1, 1 i 5 μg/mL LPS-a ne utječu na integritet stanične membrane.

Rezultati dobiveni MTS testom pokazali su da jedino 0,1 μg/mL LPS-a dovodi do povećane proliferacije stanica, dok ostale koncentracije ne utječu na metaboličku aktivnost NCI-H292 stanica. Rezultati prijašnjih istraživanja razlikuju se ovisno o tipu stanice. MTS testom na A549 stanicama nakon 24 h tretiranja s 0,1, 1 i 10 μg/mL LPS-a pokazalo se da navedene koncentracije dovode do povećanja proliferacije stanica (Hattar i sur., 2012). Međutim, BEAS-2B stanice za iste koncentracije LPS-a nisu pokazale promjenu redukcijske sposobnosti stanica (Verspohl i Podlogar, 2012). Ispitivanje vijabilnosti MTS testom na THP-1 stanicama humane monocitne stanične linije nakon tretiranja s 1, 5, 10 i 20 μg/mL LPS-a tijekom 24 h pokazalo je da koncentracije ≥10 μg/mL LPS-a dovode do smanjenja redukcijske sposobnosti stanica, dok niže koncentracije ne utječu na staničnu metaboličku aktivnost (Huang i sur., 2012).

Ispitivanje vijabilnosti NCI-H292 stanica određivanjem katalitičke aktivnosti LDH nakon tretiranja s LTA dalo je manje konzistentne rezultate. Naime, određivanjem udjela LDH u mediju u odnosu na ukupnu LDH u stanici dobiveno je da 0,1 i 0,5 μg/mL LTA uzrokuju gubitak integriteta stanične membrane. Međutim, kada su se rezultati izrazili samo kao aktivnost izlučene LDH u medij iznad stanica dobiveno je da samo 0,1 μg/mL LTA uzrokuje gubitak integriteta stanične membrane, dok je 1 μg/mL LTA uzrokovao smanjenje izlučivanja LDH u odnosu na netretirane stanice. Različita istraživanja izražavaju rezultate određivanja LDH na različite načine, iako se većina autora odlučuje za prikaz rezultata kao vijabilnosti (%), odnosno kao udio izlučenog LDH u medij u odnosu na kontrolu, za koju se uzima da je 100% (Nisihio i sur., 2013; Verspohl i Podlogar, 2012). Samo manji broj autora rezultate izražava kao udio LDH u mediju iznad stanica u odnosu na ukupni LDH u stanicama (Koff i sur., 2006). S obzirom na kontradiktornost rezultata MTS testa kojim je pokazano da nije došlo do promjene u metaboličkoj aktivnosti stanica tretiranih 1 μg/mL LTA i rezultata određivanja LDH kojim je određena smanjena aktivnost LDH izlučenog u medij, smatramo da je LDH točnije izražavati kao udio LDH u mediju u odnosu na ukupnu LDH u stanici.

Prethodna istraživanja utjecaja LTA na vijabilnost stanica su malobrojna u odnosu na istraživanja u kojima je korišten LPS. MTS testom na A549 stanicama je pokazano da tretiranje s 10, 30 i 50 μg/mL LTA tijekom 24 sata ne utječe na metaboličku aktivnost stanica (Liu i sur., 2012). Slično tome, ispitivanje MTS testom nakon 24 sata tretiranja dermalnih fibroblasta s 1, 5, 20, 50, 100 i 200 μg/mL LTA je pokazalo da jedino 200 μg/mL LTA smanjuje redukcijsku sposobnost stanica (Choi, 2010). Naše istraživanje je u skladu su s prethodno navedenima. Naime, MTS testom pokazalo se da tretiranjem NCI-H292 stanica s 0,1, 0,5, 1, 5 μg/mL LTA tijekom 24 sata nema promjena u staničnoj metaboličkoj aktivnosti.

Istraživanjem je pokazano da 0,5 μg/mL LPS uzrokuje promjenu integriteta stanične membrane, ali ne utječe na metaboličku aktivnost NCI-H292 stanica. 0,1 μg/mL LPS uzrokovao je blagu proliferaciju stanica, dok 1 i 5 μg/mL LPS-a nisu utjecali niti na integritet stanične membrane niti na redukcijsku sposobnost stanica. 0,1 i 0,5 μg/mL LTA uzrokovali su promjenu integriteta stanične membrane NCI-H292 stanica, ali ne i promjenu metaboličke aktivnosti stanica, dok 1 i 5 μg/mL LTA nisu uzrokovali promjenu integriteta stanične membrane niti redukcijske sposobnosti stanica.

5. ZAKLJUČCI

1. Optimalan rast NCI-H292 stanica na pločama s 6 jažica postiže se nasađivanjem 1 x 10^6 stanica/mL RPMI medija s 10 % FBS-a.

2. NCI-H292 stanice pokazale su vijabilnost veću od 90 % neovisno o prisutnosti 10 % FBS-a u mediju i broja nasađenih stanica 24 h nakon dodatka medija s ili bez seruma (ukupno 48 h nakon nasađivanja na ploču).

3. Priprema staničnih lizata NCI-H292 stanica puferom za lizu uz dodatno soniciranje nema značajnog utjecaja na katalitičku aktivnost LDH u odnosu na lizate pripremljene bez dodatnog soniciranja.

4. Katalitička aktivnosti LDH u mediju iznad NCI-H292 stanica ne mijenja se značajno čuvanjem uzorka dva, tri ili pet dana na +4°C ili -20°C i nije je nužno određivati isti dan nakon pripreme staničnih lizata.

5. Dodatak tablete inhibitora proteaza u pufer za lizu stanica uzrokuje smanjenje katalitičke aktivnosti LDH određivane odmah nakon pripreme staničnih lizata i u uzorcima lizata čuvanih tijekom dva, tri i pet dana na +4°C, ali ne i onih čuvanih tijekom dva, tri i pet dana na -20°C.

6. Optimizacija uvjeta za MTS test je pokazala da je na ploče sa 96 jažica najbolje nasaditi 5 x 10^3 NCI-H292 stanica/100 µL medija s 10 % FBS-a te da inkubacija nakon dodatka MTS reagensa mora trajati 4 sata.

7. LDH test je pokazao da 0,5 µg/mL LPS-a uzrokuje promjenu integriteta stanične membrane, ali MTS testom nije se pokazalo da ima utjecaj na metaboličku aktivnost NCI-H292 stanica.

8. MTS test je pokazao da 0,1 µg/mL LPS-a uzrokuje blagu proliferaciju NCI-H292 stanica.

9. 1 i 5 µg/mL LPS-a nisu pokazali utjecaj niti na integritet stanične membrane niti na metaboličku aktivnost NCI-H292 stanica.

10. LDH test je pokazao da su 0,1 i 0,5 µg/mL LTA uzrokovali promjenu integriteta stanične membrane NCI-H292 stanica, ali MTS testom nije se pokazao utjecaj na redukcijski potencijal NCI-H292 stanica.

11. 1 i 5 µg/mL LTA nisu pokazali utjecaj niti na integritet stanične membrane niti na metaboličku aktivnost NCI-H292 stanica.

6. LITERATURA

Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic Obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, 2014, 35, 71-86.

Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*, 2004, 56, 515-548.

Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 2008, 118, 3546-3556.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry, Seventh Edition. Bedford, W.H. Freeman & Company, 2011, str. 67.

Bezemer GF, Sagar S, van Bergenhenegouwen J, Georgiou NA, Garssen J, Kraneveld AD, Folkerts G. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*, 2012, 64, 337-358.

Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*, 2011, 19, 447–459.

Brown RB, Audet J. Current techniques for single-cell lysis. *J R Soc Interface*, 2008, 5, 131–138.

CellTiter 96® AQ_{ueous} one solution cell proliferation assay techincal bulletin (Instructions for use of products G3580, G3581 AND G3582), 2012, www.promega.com, pristupljeno 13.6.2015.

Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Ming Wang J. Toll-like receptors in inflamation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7, 1271-1285.

Choi JY, Lee JA, Lee JB, Yun SJ, Lee SC. Anti-inflammatory activity of Houttuynia cordata against lipoteichoic acid-induced inflammation in human dermal fibroblasts. *Chonnam Med J*, 2010, 46, 140-147.

Chronic obstructive pulmonary disease, 2015, www.who.int, pristupljeno 21.5.2015.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekulski pristup, 3. izdanje. Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 580.

COPD assessment test (CAT), 2014., www.catestonline.org, pristupljeno 22.5.2015.

Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res*, 2006, 7, 53-62.

Diaz-Guzman E, Mannino DM. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*, 2013, 35, 7-16.

Droemann D, Goldman T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Bernard Schaff. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir res*, 2005, 6, 68-74.

Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease–antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2011, 6, 413–421.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD (Updated 2015.). 2015, www.goldcopd.org, pristupljeno 18.03.2015.

Hattar K, Savai R, Subtil FS,Wilhelm J, Schmall A, Lang DS, Goldmann T, Eul B, Dahlem G, Fink L, Schermuly RT, Banat GA, Sibelius U, Grimminger F, Vollmer E, Seeger W, Grandel U. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62, 309–320.

Hou YF, Zhou YC, Zheng XX, Wang HY, Fu YL, Fang ZM, He SH. Modulation of expression and function of Toll-like receptor 3 in A549 and H292 cells by histamine. *Mol Immunol*, 2006, 43,1982-92.

Huang MY, Liao MH, Wang YK, Huang YS, Wen HC. Effect of Lavender Essential Oil on LPS-Stimulated Inflammation. *Am J Chin Med*, 2012, 40, 845–859.

Koff JL, Shao MX, Kim S, Ueki IF, Nadel JA. Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J Immunol*, 2006, 177, 8693-8700.

Lafferty EI, Qureshi ST, Schnare M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. *J Inflamm*, 2010, 7, 57-70.

Liew, FY, Xu D, Brint E, O'Neill LA. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5, 446-458.

Liu FL, Chuang CY, Tai YT, Tang HL, Chen TG, Chen TL, Chen RM. Lipoteichoic acid induces surfactant protein-A biosynthesis in human alveolar type II epithelial cells through activating the MEK1/2-ERK1/2-NF-κB pathway. *Respir Res*, 2012, 13, 88-95.

Lu Z, Xi S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *Life*, 2006, 58, 621–631.

MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2, 258–266.

Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in regulation of health and disease. *J Endocrinol*, 2007, 193, 323-330.

Mitchell JA, Sorrentino R, Cartwright N, Paul-Clark M. Toll-like receptor 2 as therapeutic target in lung disease. *Prog Resp Res*, 2010, 39, 69-72.

Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billar TR. Emerging paradigm: Toll-like receptor 4 – sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*, 2006, 26, 430-437

Morissette MC, Parent J, Milot J.Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: What we know and what we need to know. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2009, 4, 19–31.

NCIH292 [H292] (ATCC® CRL1848™), 2014, www.lgcstandards-atcc.org, pristupljeno 1.6.2015.

Nishio K, Horie M, Akazawa Y, Shichiri M, Iwahashi H, Hagihara Y, Yoshida Y, Niki E. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS) - induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. *Redox Biol*, 2013, 1, 97–103.

Optiz B, van Laak V, Eitel, J, Suttorp R. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181, 1294-1390.

Pons J, Sauleda J, Regueiro V, Santos C, Lopez M, Ferrer J, Agustí AG, Bengoechea. Exspression of Toll-like receptor 2 is upregulated in monocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2006, 7, 64-72.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 320–344.

Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013, 413735.

Sarir H, Henricks PA, van Houwelingen AH, Nijkamp FP, Folkerts G. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585, 346-353.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, 140, 805–820.

Top 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012, 2012, www.who.int, pristupljeno 21.5.2015.

Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*, 2004, 76, 514-19.

Verspohl EJ, Julia Podlogar J. LPS-Induced Proliferation and Chemokine Secretion from BEAS-2B Cells. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 3, 166-177

Vestbo J. COPD: definition and phenotypes. *Clin Chest Med*, 2014, 35, 1-6.

Von Scheele I, Larsson K, Dahlén B, Billing B, Skedinger M, Lantz AS, Palmberg L. Toll-like receptor expression in smokers with and without COPD. *Respir Med*, 2011, 105, 1222-1230.

Yarovinsky F. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14, 109–121.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Kronična opstrukcijska plućna bolest karakterizirana je pojačanom kroničnom upalom dišnih putova i pluća izazvanom stranim česticama i plinovima koja dovodi do stvaranja ispljuvka i razaranja plućnog parenhima. TLR receptori uključeni su u regulaciju urođenog i stečenog imuniteta te imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze pluća. Važni su u obrani od patogena, ali ne dozvoljavaju razvijanje pretjeranog upalnog odgovora koji bi mogao dovesti do oštećenja plućnog tkiva. Smatra se da cigaretni dim i drugi štetni čimbenici, u kombinaciji s genskom predispozicijom, djeluju na TLR receptore, dovode do njihove aktivacije, nakupljanja stanica imunosnog sustava u većem broju u dišnim putovima, otpuštanja upalnih citokina te promjena u ekspresiji gena za TLR receptore što pridonosi razvoju kronične upale.
U ovom istraživanju ispitivala se toksičnost različitih koncentracija agonista TLR receptora LPS-a (agonist TLR4) i LTA (agonist TLR2) na NCI-H292 epitelnim stanicama traheo-bronhijalnog trakta. Na taj se način pokušao oponašati upalni odgovor u bolesnika s KOPB-om. Vijabilnost stanica određivala se tripanskim plavilom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH i MTS testom.

Dobiveni rezultati su pokazali da 0,5 µg/mL LPS-a i 0,5 i 1 µg/mL LTA uzrokuju gubitak integriteta stanične membrane budući da je izmjerena povišena aktivnosti LDH u mediju iznad tretiranih stanica u odnosu na ukupan LDH u NCI-H292 stanicama. Međutim, MTS test je pokazao da te iste koncentracije ne dovode do značajne promjene redukcijske sposobnosti stanica u odnosu na kontrolu. Također, istraživanje je pokazalo da niska koncentracija LPS-a, 0,1 µg/mL, blago potiče proliferaciju NCI-H292 stanica u odnosu na kontrolu. Stoga smatramo da LPS i LTA u primijenjenim koncentracijama nisu značajno toksični za NCI-H292 stanice.

Chronic obstructive pulmonary disease is characterized by enhanced chronic airway and lung inflammation caused by inhalation of particles and gases which leads to sputum production and destruction of lung parenchyma. TLR receptors are involved in regulation of innate and acquired immunity and have a key role in maintenance of lung homeostasis. They play important part in defending against infections, but prevent excessive inflammatory response which could lead to lung destruction. It is believed that cigarette smoke and other risk factors, combined with genetics, affect TLR receptors, activate them and lead to enhanced recruitment of immune cells in the airway, proinflammatory cytokine production and changes in TLR receptor gene expression which contributes to development of chronic inflammation.

In this research we investigated toxicity of different concentrations of TLR receptor agonists LPS (TLR4 agonist) and LTA (TLR2 agonist) on NCI-H292 epithelial cells of tracheobronchial tract by mimicking inflammatory responses in COPD patients. Cell viability was determined with Trypan blue, LDH and MTT assays.

According to the results 0.5 μg/mL LPS and 0.5 and 1 μg/mL LTA caused significant loss of cell membrane integrity as shown by increased LDH activity in surrounding medium of treated NCI-H292 cells in comparison with total LDH in the cells. On the other hand, MTT assay showed no significant changes in metabolic activity between treated cells and non-treated control cells. It was also determined that low doses of LPS (0.1 μg/mL) stimulate NCI-H292 cell proliferation as compared to non-treated control cells. Therefore we suggest that applied concentrations of LPS and LTA are not considerably toxic to NCI-H292 cells.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

AP-1	aktivacijski protein 1 (*engl*. activator protein 1)
ANOVA	test jednosmjerne analize varijanci (engl. One Way Analysis of Variance)
CAT	test za procjenu KOPB-a (*engl*. COPD Assessment Test)
CLR	lektinski receptor tipa C (*engl*. C-type lectin receptor)
COX2	ciklooksigenaza 2 (*engl.* cyclooxigenase 2)
CS	cigaretni dim (*engl*. cigarette smoke)
CSE	ekstrakt cigaretnog dima (*engl*. cigarette smoke extract)
DAMP	molekulska struktura nastala oštećenjem (*engl*. damage-associated molecular pattern)
ERK	kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (*engl.* extracellular signal-regulated kinases)
FBS	fetalni goveđi serum (*engl*. fetal bovine serum)
FEV_1	forsirani izdasajni volumen u jednoj sekundi (*engl*. forced expired volume in 1 second)
FVC	forsirani vitalni kapacitet (*engl*. forced vital capacity)
GOLD	Svjetska inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (*engl*. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)
HSP	proteini toplinskog šoka (*engl*. heat shock proteins)
IL	interleukin
IL-1R	receptor za IL-1 (*engl*. interleukin-1 receptor)
IRAK	kinaze povezane s receptorom za IL-1 (*engl*. IL-1R associated kinases)
I-κB	inhibicijski kappa B protein (*engl*. inhibitory kappa B)
JNK	kinaze koje fosforiliraju N-kraj c-Jun-a (*engl*. c-Jun N-terminal kinases)
KOPB	kronična opstrukcijska plućna bolest
LDH	laktat dehidrogenaza
LPB	protein koji veže LPS (*engl.* LPS-binding protein)
LPS	bakterijski lipopolisaharid (*engl*. lipopolysaccharide)
LRR	ponavljajući slijedovi bogati leucinom (*engl*. leucine-rich repeat)
LTA	lipoteična kiselinu (*engl*. lipoteichoic acid)
Mal	adaptacijski protein sličan MyD88 (*engl*. MyD88 adaptor-like)
MAPK	proteinske kinaze aktivirane mitogenom (*engl*. mitogen-activated protein kinase)

MKK6	kinaza 6 MAPK (*engl*. mitogen-activated protein kinase kinase 6)
MMP	metaloproteinaza matriksa (*engl*. matrix metalloproteinase)
mMRC	modificirani upitnik Vijeća za medicinska istraživanja (*engl*. modified Medical research council)
MyD88	čimbenik mijeloidne diferencijacije (*engl*. myeloid differentiation factor 88)
NF-κB	jezgrin čimbenik kappa B (*engl*. nuclear factor kappa B)
NLR	receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (*engl*. nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor)
NOS II	sintaza dušikovog oksida II (*engl.* nitric oxide synthase II)
PAMP	molekulska struktura različitih mikroorganizama (*engl*. pathogen-associated molecular pattern)
PRR	receptor koji prepoznaje molekulske strukture (*engl*. pattern recognition receptors)
RLR	receptor sličan genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (*engl*. retinoic acid-inducibile gene 1 (RIG-I)-like receptor)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (*engl*. reactive oxygen species)
RSV	respiracijski sincicijski virus (*engl*. respiratory syncytial virus)
SARM	protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (*engl*. sterile-alpha and Armadillo motif containing protein)
SE	standardna pogreška (engl. *standard error*)
TAK1	kinaza koju aktivira transformirajući faktor rasta β (*engl*. transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase)
TIR	domena homologna kod TLR i IL-1 receptora (*engl*. Toll/interleukin-1 receptor homology domain)
TIRAP	adaptacijski protein s TIR domenom (*engl*. TIR adaptor protein)
TLR	receptor sličan Toll receptoru *Drosophila* vrste (*engl*. Toll-like receptor)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze α (*engl*. tumour necrosis factor α)
TRAF6	čimbenik 6 povezan s TNF receptorom (*engl.* TNF-receptor-associated factor 6)
TRAM	adaptacijska molekula srodna TRIF-u (*engl*.TRIF-related adaptor molecule*)*
TRIF	adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (*engl*. TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl*. vascular endothelial growth factor)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization)

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ AGONISTA TLR RECEPTORA NA VIJABILNOST NCI-H292 EPITELNIH STANICA

Lucija Sladoljev

SAŽETAK

Kronična opstrukcijska plućna bolest karakterizirana je pojačanom kroničnom upalom dišnih putova i pluća izazvanom stranim česticama i plinovima koja dovodi do stvaranja ispljuvka i razaranja plućnog parenhima. TLR receptori uključeni su u regulaciju urođenog i stečenog imuniteta te imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze pluća. Važni su u obrani od patogena, ali ne dozvoljavaju razvijanje pretjeranog upalnog odgovora koji bi mogao dovesti do oštećenja plućnog tkiva. Smatra se da cigaretni dim i drugi štetni čimbenici, u kombinaciji s genskom predispozicijom, djeluju na TLR receptore, dovode do njihove aktivacije, nakupljanja stanica imunosnog sustava u većem broju u dišnim putovima, otpuštanja upalnih citokina te promjena u ekspresiji gena za TLR receptore što pridonosi razvoju kronične upale.
U ovom istraživanju ispitivala se toksičnost različitih koncentracija agonista TLR receptora LPS-a (agonist TLR4) i LTA (agonist TLR2) na NCI-H292 epitelnim stanicama traheo-bronhijalnog trakta. Na taj se način pokušao oponašati upalni odgovor u bolesnika s KOPB-om. Vijabilnost stanica određivala se tripanskim plavilom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH i MTS testom.

Dobiveni rezultati su pokazali da 0,5 μg/mL LPS-a i 0,5 i 1 μg/mL LTA uzrokuju gubitak integriteta stanične membrane budući da je izmjerena povišena aktivnosti LDH u mediju iznad tretiranih stanica u odnosu na ukupan LDH u NCI-H292 stanicama. Međutim, MTS test je pokazao da te iste koncentracije ne dovode do značajne promjene redukcijske sposobnosti stanica u odnosu na kontrolu. Također, istraživanje je pokazalo da niska koncentracija LPS-a, 0,1 μg/mL, blago potiče proliferaciju NCI-H292 stanica u odnosu na kontrolu. Stoga smatramo da LPS i LTA u primijenjenim koncentracijama nisu značajno toksični za NCI-H292 stanice.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 62 stranice, 12 grafičkih prikaza, 3 tablice i 45 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: lipopolisaharid, lipoteična kiselina, TLR receptori, kronična opstrukcijska plućna bolest, NCI-H292 stanice

Mentor: **Dr. sc. Lada Rumora**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lada Rumora**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ana-Marija Domijan, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagrebu
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EFFECT OF TLR RECEPTOR AGONISTS ON NCI-H292 CELL VIABILITY

Lucija Sladoljev

SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease is characterized by enhanced chronic airway and lung inflammation caused by inhalation of particles and gases which leads to sputum production and destruction of lung parenchyma. TLR receptors are involved in regulation of innate and acquired immunity and have a key role in maintenance of lung homeostasis. They play important part in defending against infections, but prevent excessive inflammatory response which could lead to lung destruction. It is believed that cigarette smoke and other risk factors, combined with genetics, affect TLR receptors, activate them and lead to enhanced recruitment of immune cells in the airway, proinflammatory cytokine production and changes in TLR receptor gene expression which contributes to development of chronic inflammation.
In this research we investigated toxicity of different concentrations of TLR receptor agonists LPS (TLR4 agonist) and LTA (TLR2 agonist) on NCI-H292 epithelial cells of tracheobronchial tract by mimicking inflammatory responses in COPD patients. Cell viability was determined with Trypan blue, LDH and MTT assays.
According to the results 0.5 μg/mL LPS and 0.5 and 1 μg/mL LTA caused significant loss of cell membrane integrity as shown by increased LDH activity in surrounding medium of treated NCI-H292 cells in comparison with total LDH in the cells. On the other hand, MTT assay showed no significant changes in metabolic activity between treated cells and non-treated control cells. It was also determined that low doses of LPS (0.1 μg/mL) stimulate NCI-H292 cell proliferation as compared to non-treated control cells. Therefore we suggest that applied concentrations of LPS and LTA are not considerably toxic to NCI-H292 cells.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 62 pages, 12 figures, 3 tables and 45 references. Original is in Croatian language.

Keywords: lipopolysaccharide, lipotheicoic acid, TLR receptors, chronic obstructive pulmonary diease, NCI-H292 cells

Mentor: **Lada Rumora**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lada Rumora**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ana-Marija Domijan, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Anita Somborac Bačura, **Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2015.