Utjecaj ekstrakta dima cigareta na koncentraciju ATP-a u THP-1 i NCI-H292 staničnim linijama

Selar, Mihael

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:297815

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

Mihael Selar

Utjecaj ekstrakta dima cigareta na koncentraciju ATP-a u THP-1 i NCI-H292 staničnim linijama

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Ovaj diplomski rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-1247.

Zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na pruženoj pomoći, a posebno dr. sc. Andrei Hulina Tomašković i prof. dr. sc. Ladi Rumora na strpljenju, stručnim savjetima i vođenju kroz izradu diplomskog rada.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1 Kronična opstrukcijska plućna bolest 1

1.2 Protein toplinskog šoka Hsp70 3

1.3 Adenozin-trifosfat 4

1.4 Purinergijsko signaliziranje 4

1.5 Stanična smrt 7

1.5.1 Apoptoza 7

1.5.2 Nekroptoza 8

1.5.3 Piroptoza 9

1.6 Luminometrija 10

2. OBRAZLOŽENJE TEME 12

3. MATERIJALI I METODE 13

3.1 Priprema ekstrakta dima cigareta 13

3.2 Stanične linije 13

3.3 Uzgoj stanica 13

3.4 Priprema THP-1 stanica 14

3.5 Priprema NCI-H292 stanica 14

3.6 Određivanje broja stanica 14

3.7 Tretiranje stanica 15

3.8 Određivanje koncentracije ATP-a luminometrijskom metodom 15

3.9 Statistička obrada podataka 16

4. REZULTATI I RASPRAVA 17

4.1 Rezultati 17

4.1.1 THP-1 stanice 17

4.1.2 NCI-H292 stanice 21

4.2 Rasprava 25

5. ZAKLJUČCI 28
6. LITERATURA 29
7. SAŽETAK/SUMMARY 34
8. PRILOZI 36
8.1 Popis kratica 36
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD 38

1. UVOD

1.1 Kronična opstrukcijska plućna bolest

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je progresivna bolest karakterizirana učestalim respiracijskim simptomima i ograničenjem protoka zraka. Simptomi su posljedica poremećaja dišnog sustava i/ili abnormalnosti alveola uzrokovanih značajnim izlaganjem štetnim česticama ili plinovima. Kronična opstrukcija dišnih puteva karakteristična za KOPB uzrokovana je kombinacijom bolesti malih dišnih putova (opstrukcijski bronhiolitis) i uništenja parenhima (emfizem). Kronična upala uzrokuje strukturne promjene, sužava dišne putove i uništava plućni parenhim. Navedeni patološki procesi dovode do gubitka plućne elastičnosti i sposobnosti dišnih putova da budu otvoreni tijekom udisaja (GOLD, *engl.* Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2018).

Procjenjuje se da 328 milijuna ljudi u svijetu boluje od KOPB-a, 168 milijuna muškaraca i 160 milijuna žena, dok se KOPB smatra uzrokom smrti za 2,9 milijuna ljudi godišnje (Lopez-Campos i sur., 2016). KOPB predstavlja i značajan ekonomski teret. Samo u Europskoj uniji, izravni trošak za respiracijske bolesti iznosi 6 % ukupnog zdravstvenog budžeta, a KOPB je odgovoran za 56 % iznosa (38,6 milijardi eura) svih respiracijskih bolesti (GOLD, 2018).

Primarni uzrok KOPB-a je duhanski dim. Međutim, glavni čimbenici rizika razlikuju se ovisno o uvjetima života. U razvijenim zemljama su najviše ugroženi pušači, ali i sama izloženost dimu (pasivno pušenje) je čimbenik rizika (Soriano i sur., 2009). U nerazvijenim zemljama problem je zagađenje gradskog zraka, kao i unutarnje zagađenje uzrokovano korištenjem biomasa za kuhanje i grijanje (drvo, ugljen) zbog oslobađanja štetnih čestica i plinova (www.who.int). Profesionalna izloženost je također povezana s bolesti, posebno u rudarskoj industriji (ugljen i teški metali), agrokulturi (organska prašina) i ostaloj industriji (metalne pare kadmija i aluminija) (Aryal i sur., 2014). Postoje i genski čimbenici rizika, kao što je deficijencija α-1 antitripsina (AATD) koja je prisutna kod 1-2 % bolesnika. (Decramer i sur., 2012). I drugi geni su bili povezivani s KOPB-om, uključujući one koje kodiraju za transformirajući čimbenik rasta β1, čimbenik nekroze tumora α (TNF-α) i mikrosomalnu epoksidnu hidrolazu 1, međutim, istraživanja polimorfizama ovih gena do danas su u najmanju ruku nedosljedna. Prevalencija KOPB-a raste s dobi. Razlog tome je opadanje plućne funkcije u trećem i četvrtom desetljeću života. Jedan od razloga veće prevalencije KOPB-a kod starijih je popravljanje demografske slike svijeta uslijed kvalitetnije prehrane, opadanja broja infektivnih bolesti u djetinjstvu i

opadanje smrtnosti bolesti koje zahvaćaju mlađe ljude. Rezultat toga je produljenje života i veći rizik za kronične bolesti, kao što je KOPB (Mannino i Buist, 2007).

Patogenetski mehanizmi KOPB-a uključuju međudjelovanje genskih čimbenika i izloženosti čimbenicima rizika. Udahnute strane čestice i plinovi uzrokuju upalne procese u plućima koji dovode do ograničenja protoka zraka kroz dišne putove. Dim cigareta je smjesa preko 4000 kemijskih tvari štetnih za naš organizam, te kronična izloženost dovodi do izravnog oštećenja alveolarnih epitelnih i endotelnih stanica. Nastalo oštećenje dovodi do otpuštanja citokina koji privlače upalne stanice, pretežno neutrofile i makrofage koji otpuštaju proteolitičke enzime kao što su neutrofilna elastaza ili pak metaloproteinaze matriksa koje razaraju plućno tkivo. Aktivacija apoptoze dovodi do gubitka plućnog parenhima, koji u kombinaciji s nedostatnom proliferacijom alveolarnih epitelnih i endotelnih stanica narušava homeostazu pluća. Posljedično smanjenje površine za izmjenu plinova dovodi do emfizema, a uz to dim cigareta inhibira mehanizme popravka, što dodatno produžuje upalni proces i oštećuje plućno tkivo. U patogenezi bolesti značajan je i oksidacijski stres koji nastaje kao rezultat neravnoteže između stvaranja oksidansa i djelovanja antioksidanasa. Oksidansi, reaktivni kisikovi spojevi (ROS, *engl.* reactive oxygen species) i dušikovi spojevi (RNS, *engl.* reactive nitrogen species) proizlaze iz dima cigareta ili su otpušteni iz aktiviranih upalnih stanica te mogu dovesti do promjene konformacije enzima i gubitka njihove funkcije, aktivacije transkripcijskih faktora, strukturnih promjena ili ometanja mehanizama popravka. Također, kod pacijenata koji boluju od KOPB-a povišene su koncentracije CD8+ T limfocita u plućnom parenhimu, plućnim arterijama i dišnim kanalima, a oni mogu otpuštati TNF-α te tako aktivirati vanjski put apoptoze. Također, njihov broj je povišen kod infekcija nastalih kao posljedica bakterijske ili virusne infilitracije u dišni sustav. Kolonizacija bakterija u donje dišne putove je česta kod pacijenata, a može potaknuti plućnu i sistemsku upalu i otpuštanje antigena te tako ubrzati progresiju bolesti izravnim oštećenjem plućnog tkiva i povećanjem broja egzacerebracija (Decramer i sur., 2012; Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005).

Iako se KOPB smatra plućnom bolesti karakteriziranom kroničnom upalom dišnih putova, mnogi bolesnici pokazuju sistemske manifestacije bolesti koje dovode do komorbiditeta kao što su ishemijska bolest srca, osteoporoza, metabolički sindrom, gubitak mišićnog tkiva i kronični umor. Stoga se KOPB smatra i sistemskom upalnom bolešću (Decramer i sur., 2012).

1.2 Protein toplinskog šoka Hsp70

Proteini toplinskog šoka (Hsp, *engl.* Heat shock proteins) su skupina proteina koji su eksprimirani u stanicama svih organizama, a mogu biti inducibilni ili konstitutivni. Inducibilno eksprimirani javljaju se u stanicama koje su bile izložene povišenim temperaturama iz okoliša ili drugim oblicima stresa iz okoline. Uloga im je stabilizacija i olakšavanje ponovnog smatanja proteina koji su se djelomično denaturirali uslijed stresnog poticaja. Konstitutivni su eksprimirani u svim stanicama i djeluju kao molekularni šaperoni, proteini koji su nužni za smatanje proteina i njihov prijenos do odgovarajućih staničnih odredišta (Cooper i Hausman, 2004). Proteine toplinskog šoka otkrio je 1962. godine Ferrucio Ritossa primjetivši da toplinski šok uzrokuje neuobičajenu gensku ekspresiju žlijezda slinovnica u vrsti *Drosophila melanogaster* i posljedično karakteristično „napuhivanje“. Kategorizirani su u više porodica koje su imenovane na temelju njihove približne molekulske mase, pa tako imamo male Hsp, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp110, gdje, primjerice, 70 označava masu od 70 kDa (Pockley, 2003). Hsp70 porodica olakšava smatanje novosintetiziranih polipeptida na način ovisan o ATP-u i ima važnu ulogu u održavanju dinamičke stabilnosti smatanja proteina, interakcijama između proteina unutar stanice i inhibiranju agregacije proteina. Unutarstanični Hsp70 ima citoprotekcijsku, antiapoptoznu ulogu, te veliki značaj u regulaciji imunosnog odgovora (Giffard i sur., 2008).

Međutim, Hsp se može naći i izvan stanica (eHsp *engl.* exstracellular Hsp) otpuštanjem iz stanica uslijed oštećenja koje uzrokuje lizu stanica, ali i egzocitozom iz vijabilnih stanica kod kojih nije prisutno oštećenje. eHsp djeluje kao izvanstanični signal koji modulira imunosni odgovor interakcijom s raznim receptorima eksprimiranim na specifičnim imunosnim stanicama, inducirajući izlučivanje upalnih citokina (Johnson i Fleshner, 2006). eHsp se svrstava u skupinu molekularnih obrazaca oštećenja, takozvanih DAMP molekula (DAMP, *engl.* damage associated molecular patterns). To su molekule koje imaju svoju fiziološku ulogu unutar stanice, ali dobivaju nove funkcije kad su izložene izvanstaničnom okolišu. DAMP molekule signaliziraju opasnost, stimuliraju upalni odgovor i potiču proces regeneracije (Venereau i sur., 2015). U kroničnim upalama visoke koncentracije DAMP molekula predstavljaju potencijalno opasne signale koji pridonose patogenezi upalnih i autoimunih bolesti (Piccinini i Midwood, 2010).

1.3 Adenozin-trifosfat

ATP (adenozin-trifosfat) je nukleotid koji se sastoji od tri dijela: dušične baze adenina, pentoznog šećera riboze i tri fosfatne skupine. Dvije posljednje fosfatne skupine povezana su s ostatkom molekule preko tzv. energijom bogatih fosfatnih veza, svaka od njih sadrži oko 50 kJ energije po molu ATP-a u fizičkim i kemijskim uvjetima u tijelu, što predstavlja puno više energije od energije pohranjene u kemijskim vezama ostalih organskih molekula. Spomenuta kemijska veza je vrlo labilna, što omogućuje njeno trenutno razdvajanje u trenutku kad je energija potrebna za obavljanje staničnih reakcija, a to je pokretanje gotovo svih staničnih funkcija, kao što je mehanički rad, sinteza kemijskih spojeva te prijenos tvari kroz brojne stanične membrane (Guyton i Hall, 2017).

Dok većinu navedenih funkcija ATP obavlja unutar stanice, onu signalne molekule može obavljati i kao izvanstanični oblik (eATP, *engl.* extracellular ATP). Način otpuštanja izvan stanice je raznolik, ali istraživanja ukazuju da tu ulogu vrše koneksinski i paneksinski kanali zajedno s kanalima prolaznog receptorskog potencijala (Campwala i Fountain, 2013). Međutim, do „curenja“ unutarstaničnog ATP-a može doći i zbog poremećaja stanične membrane uzrokovanog mehaničkim oštećenjem ili staničnom smrti. Posljedica je brz izlazak ATP-a niz koncentracijski gradijent, od visoke unutarstanične koncentracije ATP-a do niske izvanstanične koncentacije ATP-a. U slučaju značajnog porasta koncentracije eATP-a, aktivacija membranskih nukleotidnih receptora na susjednim stanicama dovodi do jakog upalnog odgovora. U tom slučaju, eATP se smatra DAMP molekulom (Rajendran i sur., 2016).

1.4 Purinergijsko signaliziranje

Izvanstanični ATP te njemu srodni purinski i pirimidinski nukleotidi vrše svoje signalne funkcije vezanjem na membranske purinergijske P2 receptore. P2 receptori su eksprimirani po cijelom tijelu u stanicama imunosnog sustava i u ostalim stanicama. P2 receptori podijeljeni su u 2 porodice: P2Y receptore povezane s G proteinom i P2X ionske kanale. Prepoznato je 8 tipova P2Y receptora i 7 tipova P2X receptora (Fenila i sur., 2013). Dok su P2Y receptori osjetljivi na različite endogene nukleotide poput ATP-a, adenozin-difosfata (ADP-a), uridin-trifosfata (UTP-a) i druge, P2X receptori su specifični za ATP. P2X7 receptor (P2X7R) je najviše istražen član P2X obitelji, a njegova aktivacija ATP-om predstavlja važan upalni signal (Rajendran i sur., 2016).

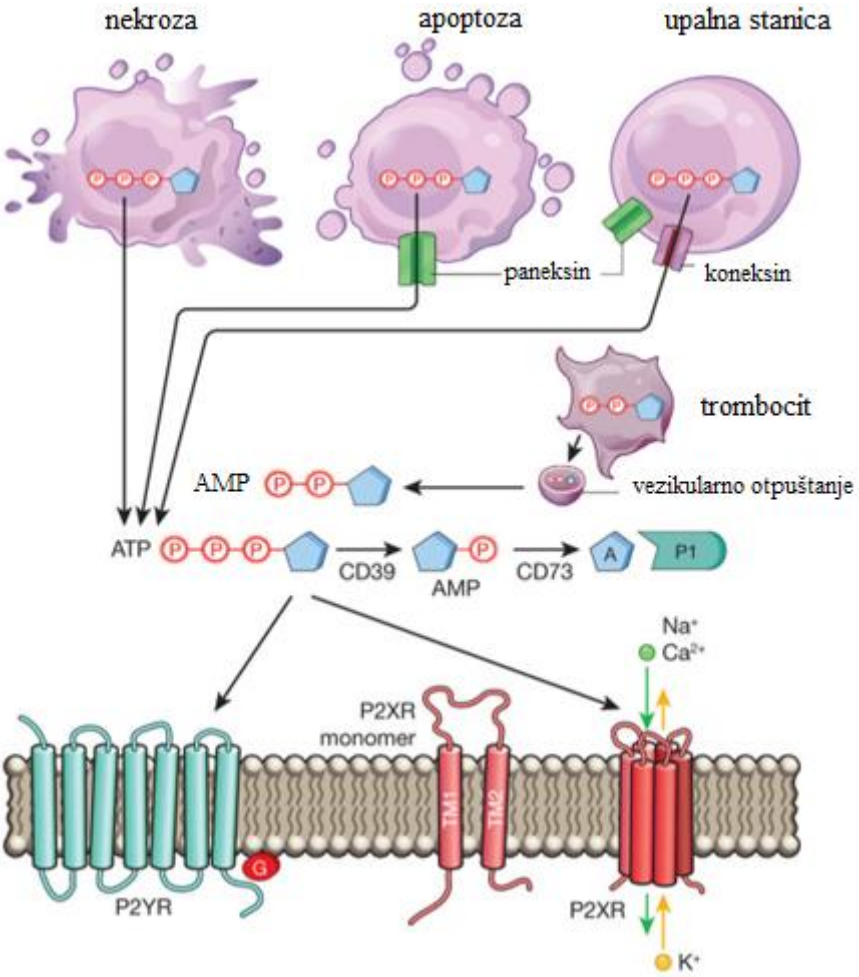
Vezanje 3 molekule eATP-a na P2X7R dovodi do otvaranja kanala, te ulaska Na^+ i Ca^{2+} u stanicu i izlaska K^+ u izvanstanični prostor. Dolazi do depolarizacije stanice, a zbog povećanja

unutarstanične koncentracija Ca^{2+} dolazi do aktivacije kalcijevih signalnih kaskada, poput p38 MAPK (MAPK, *engl.* mitogen activated protein kinase) ili fosfolipaze A2. ATP preko P2X7R aktivira NLRP3 inflamasom (NLRP3, *engl.* NOD-like receptor pyrin 3), multimerni proteinski kompleks koji se sastoji od jednog ili dva NLR receptora (*engl.* NOD- like receptors), adaptacijske molekule ASC i proteaze kaspaze-1. NLRP3 inflamasom je dio NLRP (NLR pyrin domain containing) podskupine NLR-a karakterizirane s pirinskom domenom (PYD, *engl.* pyrin domain). Samu porodicu NLR receptora čini 22 člana, od kojih je većina smještena u citoplazmi, a svi se sastoje od središnje oligomerizacijske domene koja veže nukleotide (NOD, *engl.* nucleotide-binding oligomerization domain) i od LRR slijedova (*engl.* leucine-rich repeat) za koje se vežu ligandi. NLR receptori na N-kraju sadrže i različite domene za vezanje efektorskih molekula, kao što je domena za aktivaciju i privlačenje kaspaza (CARD, *engl.* caspase activation and recruitment domain) ili pak pirinska domena (PYD), te na taj način mogu aktivirati različite signalne putove. NLRP3 se može aktivirati vezanjem DAMP molekula, poput eATP-a, udahnutim štetnim česticama ili mikrobnim molekulama, te dovodi do stanične smrti regulirane kaspazom-1 i do poslijetranslacijske aktivacije upalnih citokina, interleukina-1β (IL-1β) i interleukina-18 (IL-18). Upalni odgovor prouzrokovan aktivacijom NLRP3 inflamasoma ima bitnu ulogu u patogenezi akutnih upala plućnog tkiva te razvoju kroničnih plućnih bolesti, kao što je KOPB (Opitz i sur., 2010; Idzko i sur., 2014).

S druge strane, P2Y2 receptor je važan medijator upale čija je funkcija privlačenje imunosnih stanica na mjesto ozljede. ATP otpušten iz oštećenih stanica veže se na P2Y2R koji djeluje kao „pronađi me“ signal (*engl.* find me signal) koji privlači makrofage i neutrofile. Te stanice zatim fagocitiraju oštećene i apoptozne stanice i dovode do posljedičnog smanjenja upale. Signaliziranje preko P2Y2 receptora doprinosi i temeljnim funkcijama leukocita kao što su migracija i proizvodnja medijatora upale kod neutrofila, eozinofila i dendritičkih stanica. Dodatno, uočeno je da neutrofili u svojoj migraciji otpuštaju ATP na svojoj vodećoj strani te na taj način pojačavaju svoju kemotaksiju autokrinim djelovanjem na svoje P2Y2 receptore. Međutim, kod kroničnih upalnih bolesti poput KOPB-a dolazi do neadekvatne aktivacije P2Y2R, pojačane upale inducirane neutrofilima i oštećenja tkiva te na taj način dolazi do fibroznog remodeliranja i do daljnjeg poticanja kronične upale. Također, istraživanja su pokazala da vezanje agonista na P2Y2R, kao što je eATP, dovodi do induciranja sekrecije klorida preko inhibicije epitelnog natrijevog kanala, aktivacije o kalciju ovisnih kloridnih kanala, stimulacije produkcije mucina i sekrecije surfaktanta. Navedeni procesi dovode do

povećanja mukocilijarnog klirensa, što dovodi do poboljšanja plućne funkcije i smanjenja plućnih egzacerebracija (Idzko i sur., 2014).

Upalni učinak ATP-a prekidaju biljezi diferencijacije CD39 i CD73 (CD, *engl.* cluster of differentiation). Oni kataliziraju razgradnju ATP-a do adenozina, tako da CD39 katalizira razgradnju do AMP-a preko ADP-a, a CD73 prevodi AMP u adenozin. Na taj način dolazi do smanjenja koncentracije izvanstaničnog ATP-a i povećanja koncentracije izvanstaničnog adenozina. Adenozin aktivira P1 receptore A1, $A2_a$, $A2_b$ i A3. Signaliziranjem adenozina preko P1 receptora dolazi do slabljenja imunosnog odgovora i smirivanja upale. Djelovanje adenozina prekida se njegovim unosom u stanicu kroz uravnotežujuće prijenosnike nukleozida 1 i 2 (ENT1, ENT2, *engl*. equilibrative nucleoside transporter) (Rajendran i sur., 2016).



Slika 1. Otpuštanje izvanstaničnog ATP-a iz stanica i njegovo signaliziranje tijekom upale (preuzeto iz Idzko i sur., 2014).

1.5 Stanična smrt

Način stanične smrti je od velike važnosti u patogenezi bolesti i razvoju upale. Ona je konačni i nepovratni ishod za stanice koje su oštećene i izložene smrtonosnim signalima. Stoga je razumijevanje procesa koje dovode do nje od velikog značaja u liječenju i kontroli bolesti. ATP kao glavni energijski pokretač organizma sudjeluje u procesima imunosnog odgovora te njegova prisutnost ili odsutnost može utjecati na ishod upalnog odgovora. Aktivacija apoptozne, programirane stanične smrti, ne dovodi do razvoja upalnog procesa, dok nekroza može pogoršati upalno stanje zbog otpuštanja unutarstaničnog sadržaja u okoliš, što dovodi do aktivacije upalnih citokina i DAMP molekula (Deprez i sur., 2009, Vanden Berqhe i sur., 2014).

1.5.1 Apoptoza

Apoptoza je programirana stanična smrt koja omogućuje uklanjanje oštećenih ili inficiranih stanica. Mehanizam apoptoze je usko reguliran, a postoji više signalnih putova koji u tome sudjeluju. Vanjski put apoptoze ili put receptora smrti aktivira se različitim izvanstaničnim signalima, a posredovan je vezanjem liganada iz porodice čimbenika nekroze tumora (Fas ligand, TNF-α, *engl.* tumor necrosis factor) na receptore smrti na površini stanice (Fas, TNFR). Posljedica toga je tvorba signalnog kompleksa koji potiče smrt (DISC, *engl.* death inducing signalling complex). DISC sadrži adaptacijske molekule kao što je protein koji sadrži domenu smrti, a povezan je s Fas-om (FADD, *engl.* Fas-associated death domain). FADD aktivira kaspazu-8 koja zatim aktivira kaspazu-3, što dovodi do završne faze apoptoze, oslobađanja DNaza aktiviranih kaspazama (CAD, *engl.* caspase-activated DNAse) od svog inhibitora (ICAD, *engl.* inhibitor of caspase-activated DNAse), što rezultira fragmentacijom DNA (deoksiribonukleinske kiseline). Kaspaza-8 može pokidati pro-apoptozni Bid koji se u interakciji s Bax i Bak uklapa u membranu mitohondrija i uzrokuje oslobađanje citokroma c. Unutarnji put apoptoze ili mitohondrijski apoptozni put aktivira se različitim fizikalnim ili kemijskim signalima i uključuje otpuštanje citokroma c iz mitohondrija. Nastaje apoptosom, kompleks citokroma c, čimbenika 1 koji aktivira apoptozne proteaze (Apaf-1, *engl.* apoptotic protease activating factor-1) i kaspaze-9. Kaspaza-9 zatim aktivira kaspazu-3 koja dovodi do završne faze apoptoze koja je kod oba puta ista. Dolazi do smanjenja volumena stanice, kondenzacije kromatina i pupanja stanične membrane te stvaranja apoptoznih tjelešaca. Membranski lipid fosfatidil-serin, inače smješten na unutrašnjoj ovojnici stanične membrane, premješta se na vanjsku ovojnicu i služi za prepoznavanje apoptoznih tjelešaca od strane okolnih strukturnih stanica i imunosnih stanica koje ih fagocitiraju i uklanjaju. Apoptoza kao

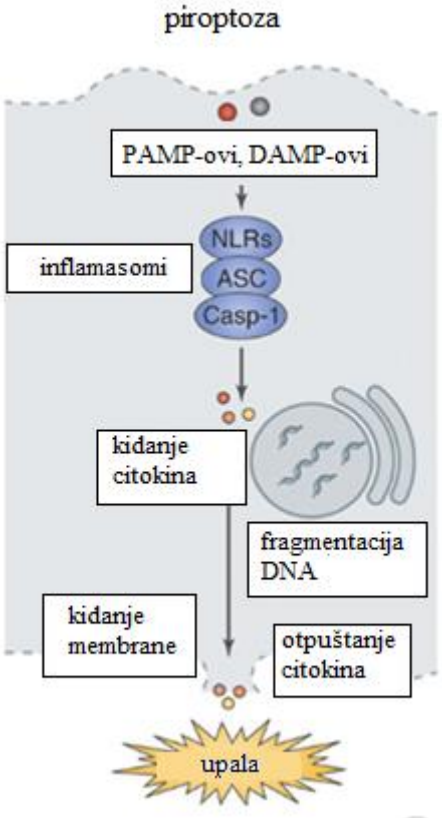
usko regulirani mehanizam zahtjeva energiju za svoje procese. Aktivacija kaspaza, hidroliza makromolekula, kondenzacija kromatina, pupanje stanične membrane i tvorba apoptoznih tjelešaca su o ATP-u ovisni procesi. U nedostatku ATP-a, način stanične smrti mijenja se iz apoptoze u nekrozu (Ashida i sur., 2011; Demedts i sur., 2009; Duprez i sur., 2009; Zamaraeva i sur., 2005).

1.5.2 Nekroptoza

Nekroptoza je jedan od oblika regulirane nekroze, upalne stanične smrti za koju se dugo smatralo da se odvija na nekontrolirani način. Mehanizam nekroptoze započinje vezanjem TNF-α za TNFR1 i tvorbe TNFR1 kompleksa I na staničnoj membrani. TNFR1 kompleks sadrži stanični protein 1 koji inhibira apoptozu (cIAP-1, *engl.* cellular inhibitor of apoptosis protein 1) i kinazu 1 koju aktivira transformirajući čimbenik rasta β (TAK1, *engl.* transforming growth factor-β-activated kinase 1). Prijelaz TNFR1 kompleksa I u TNFR1 kompleks II zahtjeva djelovanje deubikvitinirajućeg enzima cilindromatoze (CYD, *engl.* cylindromatosis), a u slučaju izostanka njegova djelovanja i prisustva poliubikvitiniranog oblika kompleksa dolazi do aktivacije jezgrinog čimbenika kappa B (NF-κB, *engl.* nuclear factor kappa B) koji dovodi do sinteze upalnih citokina. Kaspaza-8 inaktivira serin/treonin protein kinaze 1 i 3 koje stupaju u interakciju s receptorom (RIPK, *engl.* receptor-interacting serin/threonine-protein kinase) proteolitičkim kidanjem, ali u slučaju nedostatka ili inaktivacije kaspaze-8, ne dolazi do kidanja RIPK1 i RIPK3 već do njihove fosforilacije te zajedno tvore nekrosom s neaktivnom kaspazom-8, adaptacijskom molekulom FADD i proteina s inaktivnom kinaznom domenom koji je eksprimiran u različitim vrstama (MLKL, *engl.* mixed lineage kinase domain-like protein). U novostvorenom TNFR1 kompleksu II, interakcije između RIPK1 i RIPK3 potiču fosforilaciju MLKL koji zatim tvori tetramere i translocira se na staničnu membranu te ondje dovodi do ulaska Ca^{2+} u stanicu. Uz to, RIPK3 inducira stvaranje ROS-a u mitohondriju koji stimuliraju kidanje stanične membrane i izlazak staničnih organela, uključujući DAMP molekule. Nekroptoza predstavlja oblik stanične smrti neovisan o kaspazama karakteriziran upalnim procesom u kojem dolazi do gubitka integriteta stanične membrane, otpuštanja staničnog sadržaja u okoliš, bubrenja organela i povećanja volumena stanice. Istraživanja su pokazala da se nekroptoza javlja u bolesnika s KOPB-om, a cigaretni dim povećava ekspresiju RIPK3 i uzrokuje disfunkciju mitohondrija u epitelnim stanicama pluća (Mizumura i sur., 2014; Vandenabeele i sur., 2010; Zhao i sur., 2015).

1.5.3 Piroptoza

Piroptoza je još jedan oblik regulirane nekroze, međutim ovisan o kaspazi-1. Kaspaza-1 je u početku bila prepoznata kao proteaza koja kida prekursore interleukina 1β i 18 u aktivne oblike. Međutim, sada se zna da aktivacija kaspaze-1 ne dovodi samo do aktivacije navedenih upalnih citokina već i do stanične smrti karakterizirane puknućem stanične membrane i otpuštanjem staničnog sadržaja u okolinu stanice. Za njenu aktivaciju odgovoran je inflamasom. Proces aktivacije započinje kad bakterijski, virusni ili drugi neinfektivni signal izazove reakciju NLR receptora. NLRP1 inflamasom aktivira letalni toksin Bacillus anthracis, a već spomenuti NLRP3 inflamasom aktiviraju DAMP molekule poput izvanstaničnog ATP-a. Uslijed stimulacije odgovarajućim ligandom, NLR podliježe autooligomerizaciji svoje središnje oligomerizacijske domene, te preko adaptacijske molekule aktivira kaspazu-1 koja dovodi do formiranja pora u staničnoj membrani i piroptozne stanične smrti. Nastale pore u staničnoj membrani mijenjaju stanični ionski gradijent, uzrokuju osmotski pritisak, ulazak vode u stanicu, njeno bubrenje i naposljetku lizu stanica i izlazak staničnog sadržaja, te na taj način izazivaju upalni odgovor.



Slika 2. Mehanizam piroptozne stanične smrti. (preuzeto iz Askida i sur., 2011).

Aktivirana kaspaza-1 započinje upalni odgovor kidanjem prekursora upalnih citokina IL-1β, koji je jaki endogeni pirogen koji izaziva vrućicu, migraciju leukocita i ekspresiju različitih citokina i kemokina, te IL-18, koji inducira stvaranje interferona γ (IFNγ) i bitan je za aktivaciju T limfocita, makrofaga i ostalih upalnih stanica. Nakon poslijetranslacijske aktivacije navedenih interleukina, oni izlaze iz stanica kroz pore u staničnoj membrani koje stvara kaspaza. Stanice koje umiru piroptozom imaju biokemijske i morfološke karakteristike apoptozne i nekrozne smrti. Stanice u piroptozi gube svoju staničnu membranu i otpuštaju citoplazmatski sadržaj u izvanstanični prostor kao u nekrozi, dok s druge strane tijekom piroptoze dolazi do fragmentacije DNA i kondenzacije kromatina slično apoptozi. Zbog uloge kaspaze-1 i aktivacije upalnih interleukina piroptoza se smatra inicijatorom upalnog odgovora koji je dodatno induciran izlaskom staničnog sadržaja u izvanstanični prostor. Zato se piroptoza povezuje s patogenezom nekih neurodegeneracijskih i upalnih bolesti, kao što su upalna bolest crijeva ili KOPB. Kod ovih bolesti, u čijoj su pozadini upala i stanična smrt, deficijencija kaspaze-1 može rezultirati zaštitom protiv upale i smrti stanica, dok s druge strane više koncentracije kaspaze-1 dovode do induciranja piroptoze te samim time produživanja kronične upale (Bergsbaken i sur., 2009; Duprez i sur., 2009; Vande Walle i Lamkanfi, 2016).

1.6 Luminometrija

Kemiluminescencija, bioluminescencija i elektrokemiluminescencija su vrste luminescencije u kojima do ekscitacije, odnosno prijelaza elektrona u pobuđeno stanje, ne dolazi zbog povišene temperature ili izlaganja svjetlosti već zbog energije oslobođene u kemijskoj, biokemijskoj ili elektrokemijskoj reakciji. Princip emisije svjetla u kemiluminescenciji, bioluminescenciji i elektrokemiluminescenciji je sličan fluorescenciji, tj. do emisije svjetla dolazi zbog vraćanja elektrona iz pobuđenog elektronskog singlet stanja u osnovno stanje. U kemiluminescenciji do ekscitacije dolazi zbog kemijske reakcije s tvarima poput luminola, isoluminola, luciferina, vodikovog peroksida, kisika i drugih. Svjetlo se emitira iz pobuđenog produkta stvorenog u reakciji oksidacije. Za takve reakcije su potrebni katalizirajući enzimi, kao što su alkalna-fosfataza ili mikroperoksidaza, ili metalni ioni, kao što su Cu^{2+} i Mg^{2+}. Bioluminescencija je posebna vrsta kemiluminescencije koju pronalazimo u biološkim sustavima gdje enzimi poput luciferaze ili akvorina kataliziraju reakciju oksidacije. U elektrokemiluminescenciji dolazi do elektrokemijskog stvaranja reaktivnih vrsta iz stabilnih prekursora na površini elektrode. Nastale reaktivne vrste dovode do pobuđivanja elektrona i emisije svjetla. Ove metode su osjetljivije od spektrofotometrijskih i fluorimetrijskih analiza te točno detektiraju i femptomolarne koncentracije analita, međutim postoje i nedostatci kao što su propuštanje

svjetla tijekom mjerenja i problem s visokom pozadinskom interferencijom ostalih tvari prisutnih u reakcijskoj smjesi. Zbog toga je potrebno posebnu pažnju obratiti na čistoću reagensa, otapala i reakcijskih komora koji se koriste u istraživanjima (Burtis i Bruns, 2015).

Procjena metaboličke funkcije mjerenjem ATP-a u stanici je vrlo raširena metoda kojom se može odrediti vijabilnost stanica. Mnoge metode su korištene u tu svrhu, međutim najosjetljivija i najpouzdanija se pokazala metoda bioluminescencije temeljena na luciferinu i enzimu luciferazi. Iako se metoda u prošlosti suočavala s problemima ekstrakcije ATP-a iz stanica kao što su prikupljanje stanica, njihova liza i postupci odvajanja, danas su ti problemi riješeni. Upotreba modificiranih otopina za lizu stanica, čime je postignuta homogenost metode i njena jednostavnost, dovela je do postizanja visoke osjetljivosti, linearnosti i brzine pri određivanju unutarstaničnog i izvanstaničnog ATP-a (Lee i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je učestala plućna bolest karakterizirana stalnim ograničenjem protoka zraka koje je uglavnom progresivno. Strane čestice i plinovi dovode do kronične upale dišnih puteva, posljedičnog razaranja plućnog parenhima te ometanja normalnog popravka i obrambenih mehanizama. Dim cigareta se smatra glavnim čimbenikom rizika koji dovodi do strukturnih promjena dišnih putova te pojave simptoma bolesti. ATP je u stanici snižen kod nekroznog umiranja stanica, dok se ATP izlučen iz stanica smatra molekularnim obrascem oštećenja i potiče upalne odgovore u stanicama.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utječe li dim cigareta na koncentraciju ATP-a, odnosno preživljavanje stanica, u THP-1 staničnoj liniji akutne monocitne leukemije i u NCI-H292 staničnoj liniji bronhijalnog epitela, te potiče li lučenje ATP-a iz navedenih stanica u izvanstanični prostor.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Priprema ekstrakta dima cigareta

Ekstrakt dima cigarete (CSE, *engl.* cigarette smoke extract) priprema se tako da se 25 mL medija za uzgoj stanica bez seruma (RPMI-1640) zagrije na 37 °C, stavi se u plastičnu epruvetu od 50 mL te začepi epruvetu s čepom sa staklenim cjevčicama i spoji na cijev peristaltičke pumpe Mini Plus Evolution (Gilson, SAD). Cigaretama marke 3R4F Kentucky Research Cigarettes (University of Kentucky) odreže se filter te ih se umetne u prethodno odrezani nastavak epruvete od 1 mL i spoji na cijev peristaltičke pumpe. Na taj način se kroz medij propušu dvije cigarete na brzini peristaltičke pumpe od 60 rpm (70 ml/min). Svaka cigareta gorjela je oko 5 minuta. Tako pripremljen ekstrakt dima cigareta označen je kao 100 % koncentriran, a za pokuse je razrijeđen s medijem bez seruma (RPMI-1640) na željene koncentracije unutar 60 minuta od pripreme.

3.2 Stanične linije

THP-1 su stanice akutne monocitne leukemije originalno izolirane iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta. Stanice su u suspenziji i rastu u manjim grudama.

NCI-H292 su stanice mukoepidermalnog plućnog karcinoma originalno izolirane iz metastaze u limfnom čvoru 32-godišnje bolesnice. Stanice su epitelnog tipa te adheriraju na podlogu.

3.3 Uzgoj stanica

Stanice su uzgajane u bocama za uzgoj stanica (25 cm^2 ili 75 cm^2) s odgovarajućim volumenom medija za uzgoj stanica u kontroliranim uvjetima na 37 °C u atmosferi s udjelom CO_2 5 % i vlažnosti zraka 95 %. Za uzgoj stanica koristi se RPMI-1640 medij s L-glutaminom i HEPES-om, 500 mL (Capricorn, Njemačka) uz dodatak 0,055g piruvata, 50 mL fetalnog goveđeg seruma (inaktiviran toplinom; *engl.* fetal bovine serum) (South American Origin, Biosera, SAD) i 5 ml antibiotika-antimikotika koji se sastoji od penicilina (10000 U/mL), streptomicina (10 mg/mL) i amfotericina B (25 µg/mL) (Lonza, Švicarska).

Svi postupci sa stanicama se moraju odvijati u sterilnim uvjetima s uključenom UV lampom u komori za sterilan rad (laminaru) i u laboratoriju za stanične kulture najmanje 15 minuta prije početka rada. Sve reagense za uzgoj potrebno je izvaditi iz hladnjaka oko 20-30 minuta prije početka rada da se zagriju na sobnu temperaturu. Potrebna konfluentnost stanica je 80-90 % za adherirajuće stanice, što je kontrolirano invertnim mikroskopom (Diavert, Leitz, Njemačka), a

nakon postignute konfluentnosti potrebno ih je presaditi. Adherirajuće NCI-H292 stanice presađuju se najčešće 3 puta tjedno. THP-1 stanice koje rastu u suspenziji presađuju se 2 puta tjedno.

3.4 Priprema THP-1 stanica

Priprema THP-1 stanica vrši se tako da se stanice najprije iz boca za uzgoj prenesu u sterilne epruvete i centrifugiraju 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi. Vakuum sisaljkom se ukloni nadsloj, a talog stanica resuspendira u 1 mL medija za uzgoj stanica. Stanice se izbroje u Neubauerovoj komorici pomoću tripanskog plavila, razrijede na potrebni broj stanica i nasade na ploče uz dodatak 20 nM forbol 12-miristat-13-acetata (PMA) koji služi za diferencijaciju stanica u makrofage, te se prije pokusa inkubiraju 48 sati na 37 °C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

3.5 Priprema NCI-H292 stanica

Za pripremu NCI-H292 stanica najprije je potrebno ukloniti sav medij iznad adheriranih stanica vakuum sisaljkom te ih dva puta isprati otopinom etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA). Nakon toga potrebno je dodati 0,25 % otopinu tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, SAD) i stanice inkubirati 5 minuta na 37 °C s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2 kako bi tripsin odvojio stanice od podloge. Ukoliko se stanice nakon 5 minuta nisu odvojile od podloge u dovoljnom broju mogu se inkubirati još najviše 2 minute, zatim ih se dobro protrese i pogleda pod invertnim mikroskopom. Djelovanje tripsina zaustavlja se dodatkom medija za uzgoj stanica pa se zatim stanice prenesu u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugiraju 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi. Vakuum sisaljkom se ukloni nadsloj, a talog stanica se resuspendira u 1 mL medija za uzgoj stanica. Stanice se izbroje u Neubauerovoj komorici pomoću tripanskog plavila, razrijede na potrebni broj stanica i nasade na ploče, te se prije pokusa inkubiraju 24 sata na 37 °C, s 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.

3.6 Određivanje broja stanica

Za pokus je bitno odrediti točan broj stanica te udio živih i mrtvih stanica u ukupnom broju stanica na način da se u 10 µL suspenzije stanica doda 40 µL 0,4 % boje tripansko plavilo (Lonza Group Ltd, Švicarska). Nakon dvije minute inkubacije 10 µL otopine prenese se u Neubauerovu komoricu i stanice se broje pod invertnim mikroskopom pri povećanju od 400 puta. Uz pomoć tripanskog plavila možemo razlikovati žive i mrtve stanice zato jer ga žive stanice izbacuju pomoću membranskih pumpi i ostaju neobojene, a mrtve stanice ga ne mogu

izbaciti pa se tripansko plavilo u njima akumulira te one ostaju obojene. Obojane (mrtve) stanice ne uzimamo u obzir kod brojanja stanica za presađivanje ili zamrzavanje.

3.7 Tretiranje stanica

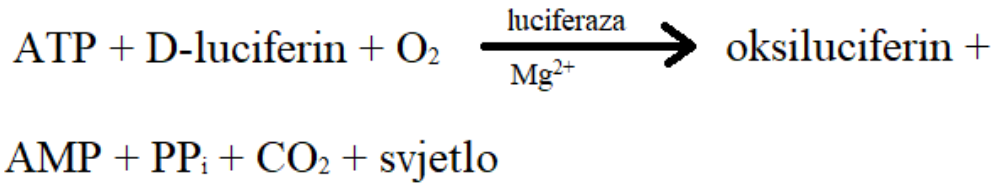
THP-1 stanice nasađene su na bijelim pločicama s 96 jažica za određivanje ukupnog ATP-a ili na bezbojnim pločicama s 96 jažica za određivanje ATP-a u mediju. Korišteno je 10000, 25000 i 50000 stanica po jažici u triplikatu. Nakon 48 sati inkubacije s 20 nM PMA stanice se tretiraju s 2,5 % CSE i 5 % CSE tijekom 1, 2, 4 i 24 sata. Netretirane stanice su korištene kao negativna kontrola.

NCI-H292 stanice nasađene su na bijelim pločicama s 96 jažica za određivanje ukupnog ATP-a ili na bezbojnim pločicama s 96 jažica za određivanje ATP-a u mediju. Korišteno je 1000, 5000 i 10 000 stanica po jažici u triplikatu. Nakon 24 sata stanice su tretirane s 2,5% CSE i 15% CSE tijekom 1, 2, 4 i 24 sata. Netretirane stanice su korištene kao negativna kontrola.

3.8 Određivanje koncentracije ATP-a luminometrijskom metodom

U našem istraživanju korišten je komercijalni ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer, SAD). To je metoda za mjerenje ATP-a bazirana na enzimu luciferazi iz krijesnice (Photinus pyralis). Test je alternativa kolorimetrijskom i fluorimetrijskom testu za kvantitativno procjenjivanje proliferacije kultiviranih stanica i citotoksičnosti agensa kojim se stanice tretiraju. Glavne prednosti testa su visoka osjetljivost, odlična linearnost, jednostavnost, brzi rezultati i izostanak koraka sakupljanja stanica ili njihova odvajanja. Uz to, ATPlite je karakteriziran dugim trajanjem svjetlosti s vremenom poluraspada dužim od pet sati, pa nije potreban poseban luminometar s injektorima. Još jedan problem koji ATPlite uspješno nadilazi je prisutnost endogenih degradirajućih enzima, ATPaza, na način da podiže pH stanične kulture dodatkom otopine za lizu stanica koja inaktivira ATPaze. Dodatak otopine supstrata u sljedećem koraku snizuje pH do razine koja je povoljna za odvijanje reakcije (https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN-ATPlite.pdf).

Princip metode se zasniva na stvaranju svjetla u reakciji ATP-a s D-luciferinom uz prisutnost kisika, enzima luciferaze i magnezijevih iona. Emitirano svjetlo proporcionalno je koncentraciji ATP-a u granicama linearnosti. Navedena reakcija prikazana je na slici 3.



Slika 3. Reakcija ATP-a i D-luciferina (preuzeto sa https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN-ATPlite.pdf).

Prije početka ispitivanja potrebno je pričekati da se svi reagensi iz ATPlite kita za detekciju stabiliziraju na sobnoj temperaturi. Isto tako, prije početka rada potrebno je pripremiti bočicu liofiliziranog supstrata tako da se u nju doda 5 mL otopine pufera i lagano promiješa. Kad je prošlo vrijeme inkubacije od 1, 2, 4 i 24 sata određuje se koncentracija ATP-a u stanicama i u mediju izvan stanica. U svaku jažicu dodaje se 50 µL otopine za lizu stanica iz kita i pločica se stavlja na tresač 5 minuta na 700 rpm. Ovaj korak lizira stanice i stabilizira ATP. Zatim se dodaje 50 µL otopine supstrata i ponovno se ploču stavlja na tresač 5 minuta na 700 rpm. Nakon toga se pločica ostavi pokrivena 10 minuta aluminijskom folijom da se izbjegne utjecaj svjetla. Za mjerenje emitiranog svjetla koje je proporcionalno koncentraciji ATP-a u jažici koristi se čitač mikrotitarskih pločica Victor 3 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, SAD)

3.9 Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati pokusa analizirani su upotrebom programa GraphPad Prism 6, verzija 6.01 (GraphPad Software Inc., SAD). Za analizu statističkih razlika između testiranih skupina korišteni su parametrijski testovi: test za usporedbu više od dvije skupine podataka - test jednosmjerne analize varijanci (ANOVA, *engl.* One Way Analysis of Variance), test za usporedbu dvije skupine podataka (t-test) i Sidakov test značajnosti za post hoc analizu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti. Za statistički značajnu razliku uzeta je vrijednost $P<0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

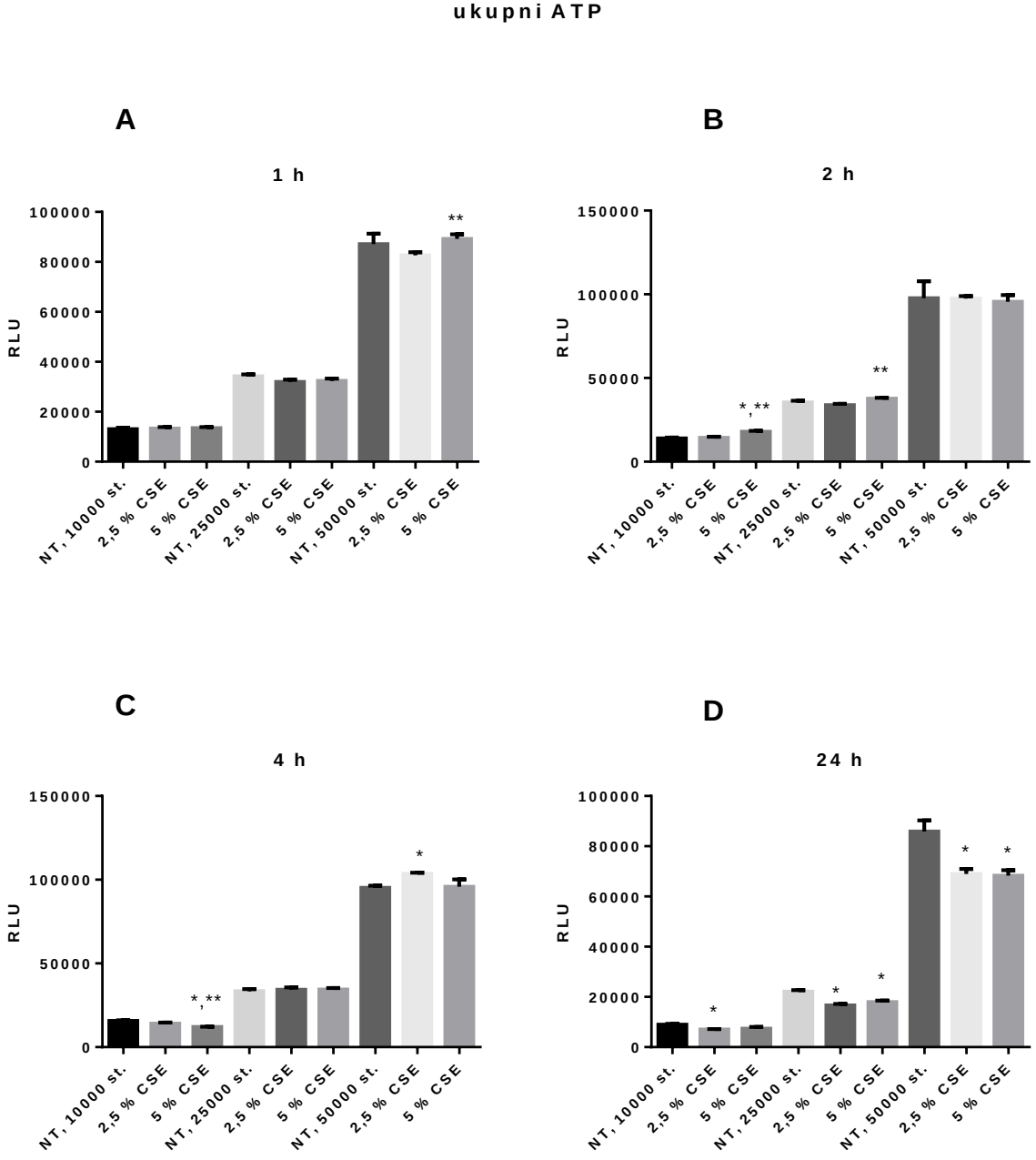
4.1 Rezultati

U istraživanju su korištene THP-1 stanična linija (10000, 25000 i 50000 stanica po jažici) i NCI-H292 stanična linija (1000, 5000 i 10000 stanica po jažici). Nakon tretiranja stanica s 2,5 % i 5 %, odnosno 2,5 % i 15 % CSE tijekom 1, 2, 4 i 24 sata određivala se koncentracija ukupnog ATP-a te koncentracija ATP-a u mediju iznad stanica komercijalnim kitom za mjerenje ATP-a luminometrijskom metodom. Rezultati su dobiveni mjerenjem intenziteta emitiranog svjetla na čitaču mikrotitarskih pločica, gdje je emisija svjetla proporcionalna koncentraciji ATP-a u uzorku. Kao negativna kontrola korištene su netretirane stanice.

4.1.1 THP-1 stanice

Rezultati mjerenja ukupnog ATP-a u THP-1 staničnoj liniji tijekom 1 sata tretiranja nisu pokazali statistički značajnu promjenu niti kod 2,5 % niti kod 5 % CSE u odnosu na netretirane stanice. Nakon 2 sata tretiranja došlo je do blagog porasta koncentracije ATP-a nakon izlaganja 5 % CSE kod 10000 stanica (17882 ± 566,7 prema 14258 ± 715,5 za NT stanice) što ukazuje na blagi proliferacijski učinak CSE-a. U dužem vremenskom periodu, nakon 4 sata, uočen je statistički značajan pad koncentracije ATP-a u odnosu na netretrirane stanice uz 5 % CSE kod 10000 stanica (P=0,0019), ali i povišena koncentracija kod 50000 stanica tretiranih s 2,5 % CSE-a (P=0,0045). Nakon 24 sata dolazi do značajnijeg pada koncentracije ATP-a kod sva tri broja stanica u odnosu na netretirane stanice, za 2,5 % CSE kod 1000, 25000 i 50000 stanica (P=0,0311, P=0,0009, P=0,0148), a za 5 % CSE kod 25000 i 50000 stanica (P=0,0041, P=0,0126).

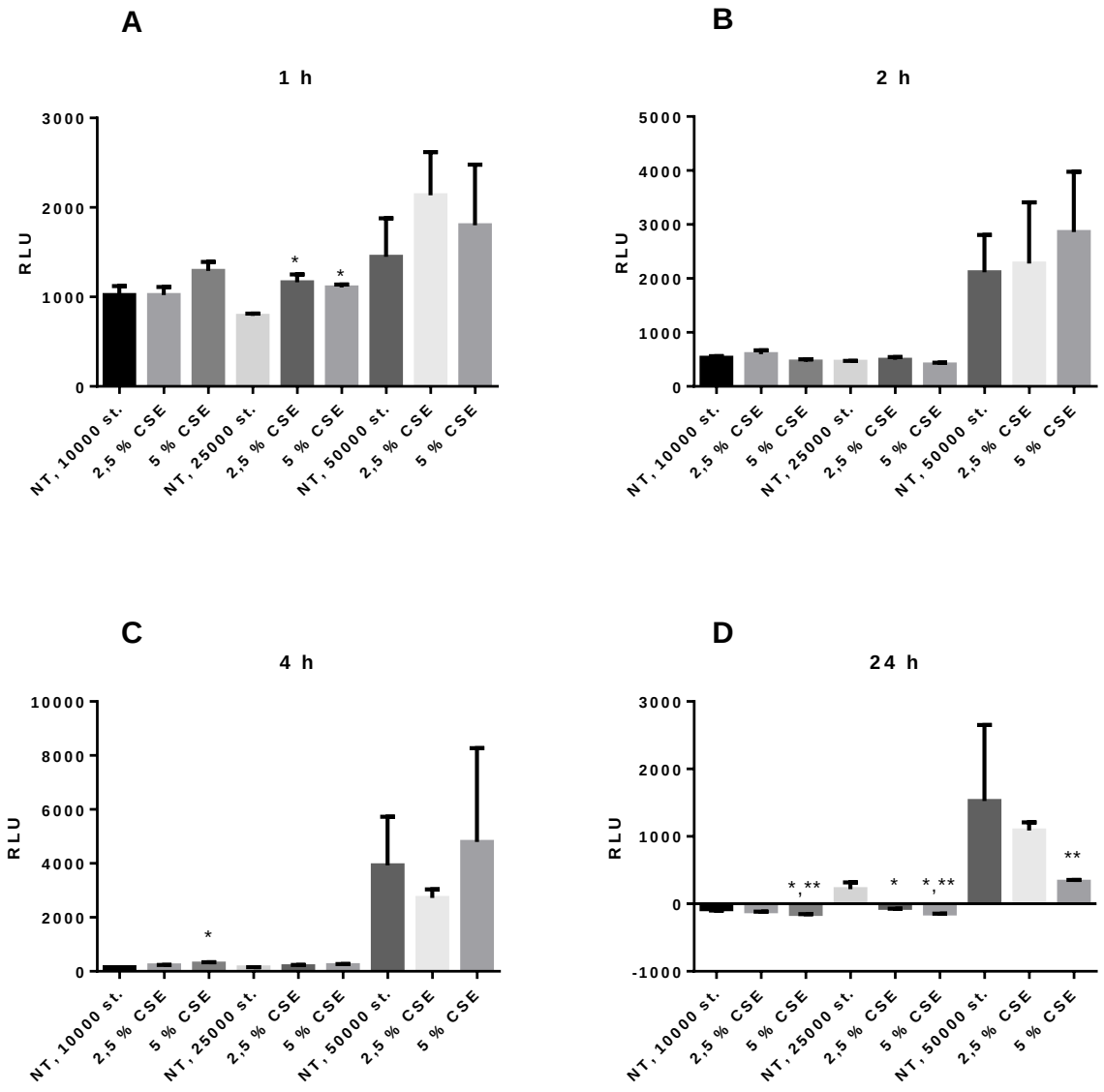
Uspoređujući međusobno 2 različite koncentracije ekstrakta dima cigareta, statistička razlika među njima prisutna je kod tretiranja 10000 stanica 2 i 4 sata (P=0,0165, P=0,0371), kod tretiranja 25000 stanica 2 sata (P=0,1379), te kod tretiranja 50000 stanica 1 sat (P=0,0412).



Slika 4. Ukupni ATP u THP-1 stanicama nakon tretiranja s 2,5 % i 5 % CSE-a tijekom 1 sata (A), 2 sata (B), 4 sata (C) i 24 sata (D). NT su netretirane, kontrolne stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se $P<0,05$ (*), statistički značajnom razlikom stanica tretiranih s 5 % CSE u odnosu na stanice tretirane s 2,5 % CSE smatra se $P<0,05$ (**).

Mjerenjem izvanstaničnog ATP-a izlučenog iz THP-1 stanica dobili smo rezultate koji upućuju na povećano izlučivanje ATP-a u medij ili smanjenje koncentracije ATP-a u medij, što se može pripisati učinku prisutnih ATP-aza koje su razgradile ionako niske koncentracije ATP-a. Tako smo za stanice tretirane s 2,5 % CSE-a dobili statistički značajan porast koncentracije ATP-a u odnosu na netretirane stanice samo kod 25000 stanica tretiranih 1 sat (P=0,0069). Kod tretiranja stanica s 5 % CSE porast koncentracije također je prisutan kod 25000 stanica tretiranih 1 sat (P=0,0150), ali i kod 10000 stanica tretiranih 4 sata (P=0.0443). U dužem vremenskom periodu, odnosno nakon tretiranja stanica 24 sata, jasno je vidljiv degradirajući učinak ATP-aza. Statistički značajan pad koncentracije ATP-a u odnosu na kontrolne, netretirane stanice prisutan je kod obje koncentracije ekstrakta dima cigareta, tj. kod 2,5 % CSE kod 25000 (P=0,0283), te kod 10000 i 25000 stanica tretiranih s 5 % CSE (P=0,0140, P=0,0086).

Promatrajući odnos različitih koncentracija ekstrakta dima cigareta, statistička razlika među njima prisutna je samo kod dužeg tretiranja, tj. nakon 24 sata kod sva tri broja stanica.

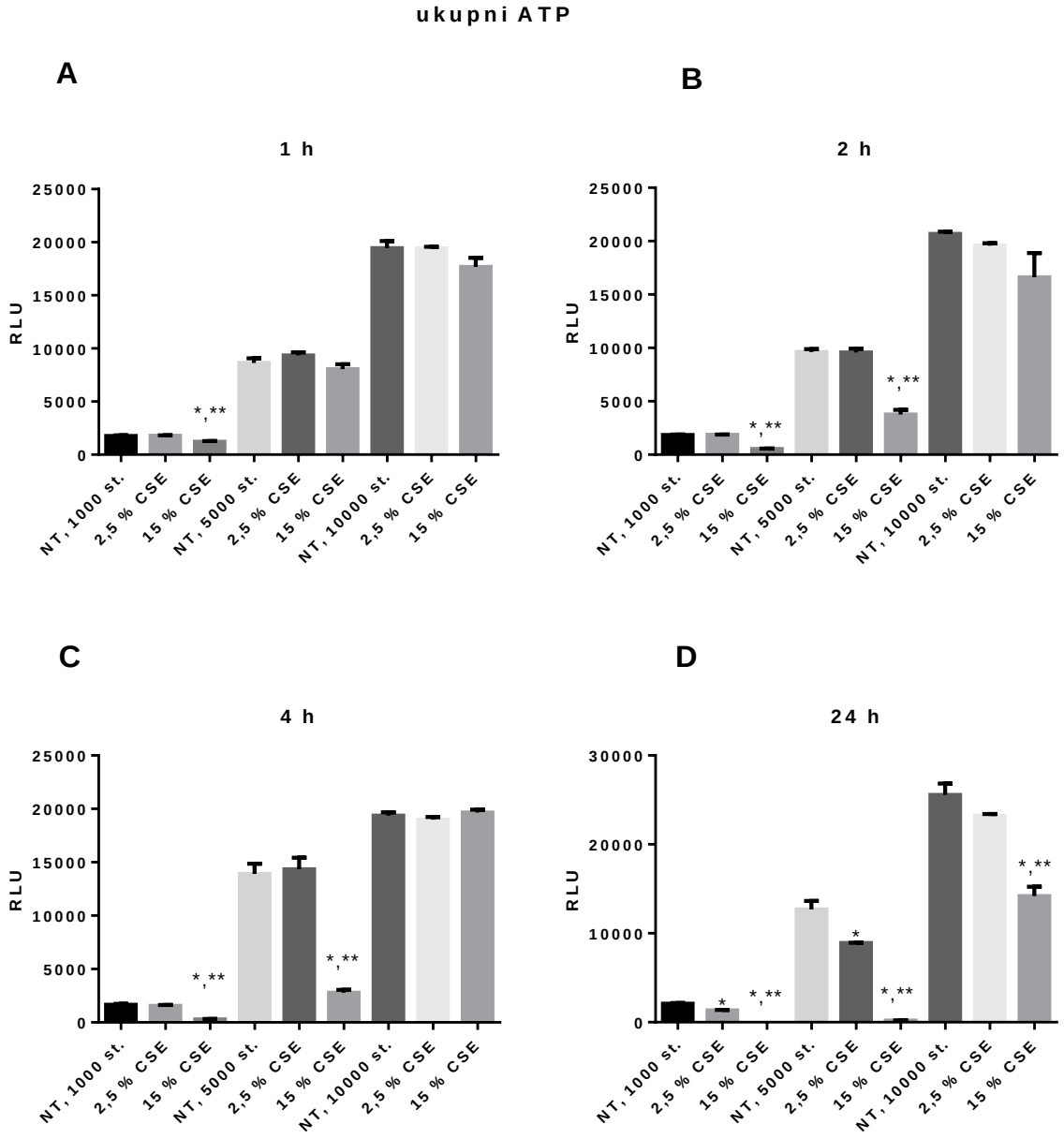


Slika 5. Izvanstanični ATP izlučen iz THP-1 stanica nakon tretiranja s 2,5 % i 5 % CSE-a tijekom 1 sata (A), 2 sata (B), 4 sata (C) i 24 sata (D). NT su netretirane, kontrolne stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P<0,05 (*), statistički značajnom razlikom stanica tretiranih s 5 % CSE u odnosu na stanice tretirane s 2,5 % CSE smatra se P<0,05 (**).

4.1.2 NCI-H292 stanice

Rezultati mjerenja ukupnog ATP-a u NCI-H292 stanica tretiranih s 15 % CSE-a pokazali su da do statistički značajnog smanjenja koncentracije ATP-a u odnosu na netretirane stanice dolazi u svim vremenskim točkama za 1000 stanica ($P=0,0017$, $P<0,0001$, $P<0,0001$, $P<0,0001$), kod 5000 stanica ta je razlika značajna samo kod duljeg vremena tretiranja, odnosno 2, 4 i 24 sata ($P<0,0001$, $P<0,0001$, $P<0,0001$), a kod 10000 stanica je razlika značajna samo nakon 24 sata ($P=0,0003$). Stanice tretirane s 2,5 % CSE-a pokazale su statistički značajno smanjenje koncentracije ATP-a u odnosu na kontrolne, netretirane stanice samo nakon 24 sata uz 1000 ($P<0,0001$) i 5000 stanica ($P=0,0055$).

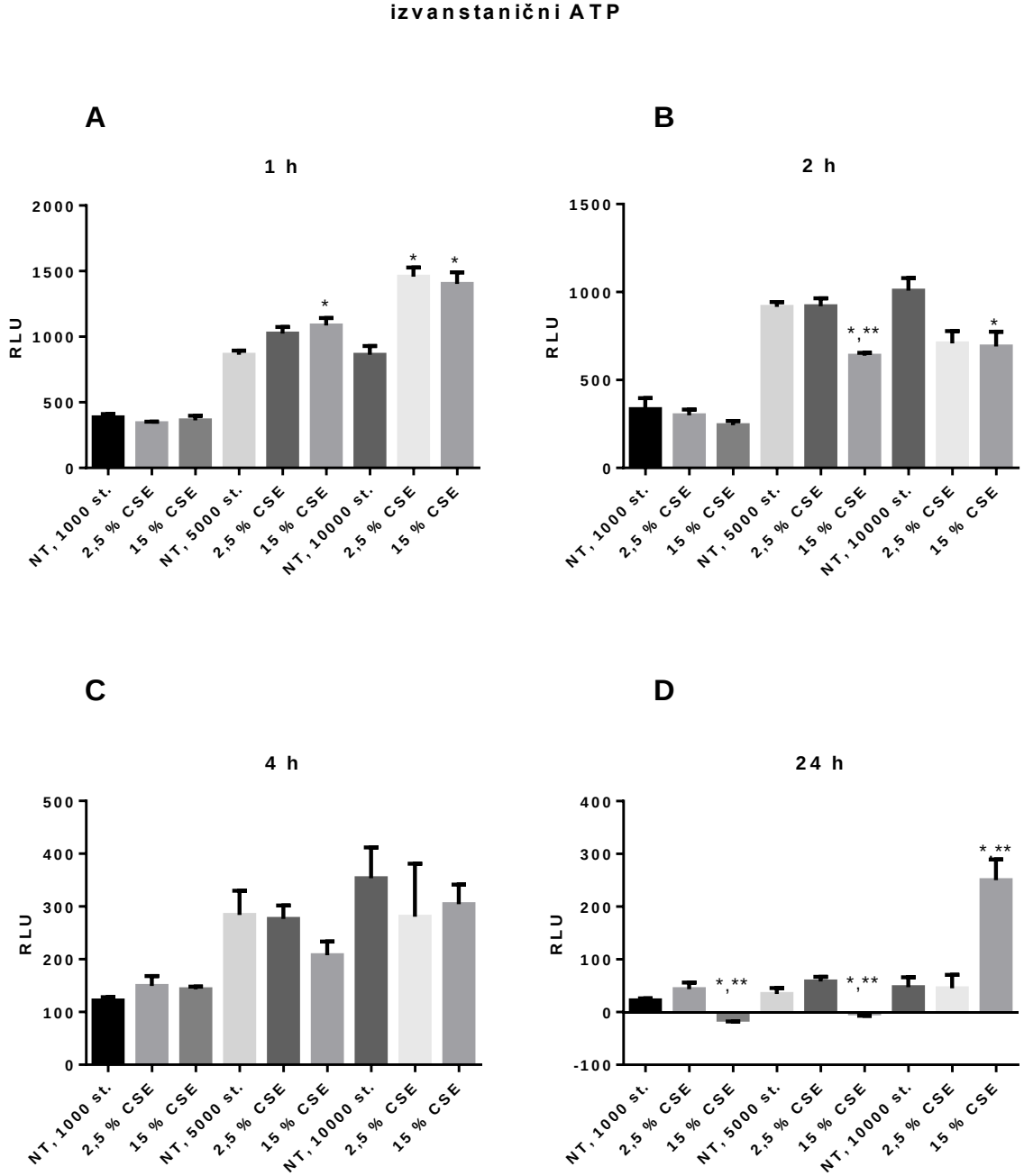
Međusobnom usporedbom koncentracija ATP-a u stanicama tretiranim s 2,5 % i 15 % CSE-a, uočena je statistički značajna razlika između onih tretiranih 1 sat uz 1000 stanica, nakon 2 i 4 sata uz 1000 i 5000 stanica, dok je nakon 24 sata razlika bila značajna kod sva tri broja stanica.



Slika 6. Ukupni ATP u NCI-H292 stanicama nakon tretiranja s 2,5 % i 15 % CSE-a tijekom 1 sata (A), 2 sata (B), 4 sata (C) i 24 sata (D). NT su netretirane, kontrolne stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P<0,05 (*), statistički značajnom razlikom stanica tretiranih s 15 % CSE u odnosu na stanice tretirane s 2,5 % CSE smatra se P<0,05 (**).

Mjerenje ATP-a u mediju iznad stanica, pokazalo je njegovo statistički značajno lučenje kod stanica tretiranih s 2,5 % CSE samo za 10000 stanica tretiranih 1 sat (P=0,0028). 15 % CSE potaknuo je značajno lučenje ATP-a iznad stanica u odnosu na netretirane stanice nakon 1 sata za 5000 (P=0,0322) i 10000 stanica (P=0,0046), te nakon 24 sata za 10000 stanica (P=0,0054). Nakon 2 sata tretiranja imamo i statistički značajan pad koncentracije ATP-a u odnosu na netretirane stanice kod 5000 i 10000 stanica (P=0,0017, P=0,494). Također, pad koncentracije ATP-a prisutan je i kod 1000 i 5000 stanica (P= 0,0314, P= 0,0486) tretiranih s 15 % CSE-a tijekom 24 sata. Izlaganje 1000 stanica 2,5 % CSE-u nije se pokazalo značajnim ni u jednoj vremenskoj točci.

Usporedbom stanica tretiranih s 2,5 % i 15 % CSE-a pokazalo se da se lučenje ATP-a razlikuje s obzirom na koncentraciju CSE-a. Statistički značajnom se pokazala razlika uz 5000 stanica tretiranih 2 sata te uz sva tri broja stanica tretiranih 24 sata.



Slika 7. Izvanstanični ATP izlučen iz NCI-H292 stanica nakon tretiranja s 2,5 % i 15 % CSE-a tijekom 1 sata (A), 2 sata (B), 4 sata (C) i 24 sata (D). NT su netretirane, kontrolne stanice. Statistički značajnom razlikom u odnosu na netretirane stanice smatra se P<0,05 (*), statistički značajnom razlikom stanica tretiranih s 15 % CSE u odnosu na stanice tretirane s 2,5 % CSE smatra se P<0,05 (**).

4.2 Rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj CSE-a na koncentraciju ATP-a, odnosno preživljavanje THP-1 i NCI-H292 staničnih linija. Luminometrijskom metodom izmjerena je koncentracija ukupnog i izvanstaničnog ATP-a, a s obzirom da su koncentracije eATP-a jako niske, koncentracije dobivene za ukupni ATP ukazuju na promjene unutarstaničnih koncentracija ATP-a. Uz to, s obzirom da preživljavanje stanica korelira sa staničnom energijom, promjene koncentracije ATP-a ukazuju na promjene vijabilnosti stanica. Kao sistemski model KOPB-a korištena je stanična linija humanih monocitnih stanica THP-1, a kao plućni model KOPB-a korištena je stanična linija humanih bronhijalnih epitelnih stanica NCI-H292.

Dim cigareta uzrokuje izravno oštećenje alveolarnih epitelnih stanica koje vodi otpuštanju citokina i upalnih medijatora koji privlače upalne stanice i, ovisno o težini oštećenja, dovode do apoptoze stanica (Decramer i sur., 2009). Određivanje koncentracije ATP-a daje nam uvid u preživljavanje stanica tretiranih s CSE-om, na temelju čega možemo utvrditi citotoksičnost ekstrakta dima cigareta na THP-1 i NCI-H292 stanične linije.

Naši rezultati pokazali su da 15 % CSE dovodi do statistički značajnog smanjenja koncentracije ukupnog ATP-a kod NCI-H292 stanica u svim vremenskim točkama, s izraženijim učinkom kod manjeg broja stanica, a tretiranje s 2,5 % CSE-a do smanjenog preživljavanja stanica nakon 24 sata. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima istraživanja Luppija i suradnika, u kojem je kondenzat dima cigareta pokazao citotoksično djelovanje na NCI-H292 staničnu liniju. Naime, visoke koncentracije oksidansa i drugih radikala iz dima cigareta dovode do oksidacijskog stresa koji pridonosi nekrozi. Pokazali su da pri visokim koncentracijama dima cigareta dolazi do aktivacije apoptoznih signalnih putova p38 MAPK i c-Jun N-termalne kinaze (JNK, *engl*. c-Jun N-terminal kinase), ali ne i do aktivacije kinaza 1 i 2 reguliranih izvanstaničnim signalima koje potiču proliferaciju (ERK, *engl*. extracellular signal-regulated) (Luppi i sur., 2005).

Proliferacijski učinak obje koncentracije dima cigareta na THP-1 stanice primjećen je nakon tretiranja tijekom 2 i 4 sata. U sličnom istraživanju Wanga i suradnika na epitelnim tumorskim stanicama CP-C, uočena su ista proliferacijska djelovanja CSE-a, no produljenjem vremena tretiranja stanica, proliferaciju zamjenjuje citotoksičnost. Naime, kraća izloženost nižim koncentracijama CSE-a, iako uzrokuje izravno oštećenje membrane, ne mora značiti smrt stanice i smanjenje koncentracije ATP-a, već stanica može nastaviti svoj životni ciklus (Wang

i sur., 2005). Citotoksično djelovanje CSE na THP-1 stanice utvrdio je i Brunssen sa suradnicima, u čijem je istaživanju dokazano smanjeno preživljavanje stanica nakon njihova tretiranja tijekom 24 sata (Brunssen i sur., 2017). Naši rezultati pokazuju statistički značajan pad koncentracije ukupnog ATP-a u odnosu na netretirane stanice kod sva tri broja stanica nakon 24 sata, što se podudara s navedenim literaturnim podatcima. U istraživanju Phillipsa i suradnika, ispitana je povezanost koncentracije CSE-a i vijabilnosti stanica. Njihovi rezultati pokazuju izravan učinak koncentracije CSE-a na preživljavanje NCI-H292 stanica, tj. viša koncentracija CSE-a značajnije je smanjila vijabilnost stanica u odnosu na niže koncentracije CSE-a u istom vremenskom periodu (Phillips i sur., 2005). Ovi rezultati u skladu su s našim istraživanjem i kod NCI-H292 i THP-1 staničnih linija.

Izlazak ATP-a u medij iznad NCI-H292 stanica u našem istraživanju statistički je značajan za obje koncentracije CSE-a. Ovi rezultati potvrđuju teorijska saznanja o nekroznoj smrti stanica. U nekrozi zbog gubitka integriteta stanične membrane dolazi do izlaska staničnog sadržaja izvan stanice. Na taj način DAMP molekule, poput Hsp70, mokraćne kiseline ili ATP-a, dospijevaju u okoliš u kojem potenciraju upalni odgovor. Tako dolazi i do aktivacije NLRP3 inflamasoma i posljedičnog stvaranja IL-1β i IL-18 ili do privlačenja ostalih upalnih stanica poput makrofaga i neutrofila (Vanlangenakker i sur., 2008). Istraživanja Baxtera i suradnika, kao i Praetoriusa i Leipzigera, pokazala su da do povišene koncentracije izvanstaničnog ATP-a dolazi u *in vitro* i u *in vivo* modelima upale izazvane ekstraktom dima cigareta, ali i u plućima pacijenata koji boluju od KOPB-a. Uz izlazak ATP-a iz umirućih stanica, bitnu ulogu u njegovoj regulaciji imaju i kanali koje stvara paneksin 1, zajedno s kanalima prolaznog receptorskog potencijala. To su i pokazali izlaganjem humanih bronhijalnih epitelnih stanica dimu cigareta u kombinaciji s odgovarajućim antagonistima tih kanala (Baxter i sur., 2014; Praetorius i Leipziger, 2009).

U istraživanju smo uočili i pad koncentracije izvanstaničnog ATP-a nakon 24 sata tretiranja stanica ekstraktom dima cigareta kod THP-1 i NCI-H292 staničnih linija, a i nakon 2 sata tretiranja NCI-H292 stanične linije. Tu pojavu možemo objasniti prisustvom ATP-aza iz obitelji ektonukleozid-trifosfat-difosfohidrolaza (ENTPD-ase, *engl.* ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) koje hidroliziraju izvanstanične nukleotide te tako kontroliraju njihovu dostupnost nukleotidnim purinergijskim P1 i P2 receptorima. Razgradnjom ATP-a, signalne molekule P2 nukleotidnih receptora, i nastankom adenozina, lignada P1 receptora, dolazi do slabljenja upalnog odgovora. Nukleozidi kao posljednji produkti

hidrolize nukleotida mogu se zatim unijeti u stanicu pomoću specifičnih transportera i ponovno upotrijebiti (Zimmermann i sur., 2012).

Zaključno, u ovom radu pokazali smo da CSE u kraćem vremenu tretiranja i nižim koncentracijama može djelovati proliferacijski na THP-1 staničnu liniju. Također, povećanjem koncentracije CSE-a prevladava njegova citotoksičnost, što upućuje na značajan utjecaj CSE-a na vijabilnost stanica. Smanjenje koncentracije unutarstaničnog ATP-a kod obje stanične linije i sva tri broja stanica kod kojih smo provodili istraživanje ukazuju na citotoksičnost CSE-a potičući umiranje stanica nekrozom. Iako je u dužim vremenskim točkama došlo do smanjenja koncentracije izvanstaničnog ATP-a zbog aktiviranih ATP-aza, CSE dovodi do povećanja koncentracije eATP-a, te tako potencira upalni odgovor.

5. ZAKLJUČCI

- Tretiranje THP-1 stanica s 2,5 % CSE-a tijekom 4 sata dovodi do porasta ukupne koncentracije ATP-a u odnosu na netretirane stanice za 50000 stanica, a 5 % CSE-a tijekom 2 sata za 10000 stanica, što ukazuje na proliferacijski učinak CSE-a.

- 5 % CSE smanjuje koncentraciju ATP-a u THP-1 stanicama u odnosu na netretirane stanice za 10000 stanica nakon 4 sata, a nakon 24 sata 2,5 % i 5 % CSE smanjuju ukupnu koncentraciju ATP-a za 10000, 25000 i 50000, odnosno 25000 i 50000 stanica, što ukazuje na moguće smanjenje vijabilnosti stanica.

- Lučenje ATP-a u medij iznad THP-1 stanica u odnosu na netretirane stanice prisutno je samo kod tretiranja 25000 stanica tijekom 1 sata s 2,5 % i 5 % CSE-a, te za 10000 stanica tretiranih 4 sata s 5 % CSE-a.

- Kod sva tri broja THP-1 stanica tretiranih CSE-om tijekom 24 sata dolazi do pada koncentracije izvanstaničnog ATP-a u odnosu na netretirane stanice zbog djelovanja ATP-aza. Isti učinak imamo kod NCI-H292 stanica tretiranih s 15 % CSE-om tijekom 2 sata za 5000 i 10000 i 24 sata za 1000 i 5000 stanica.

- Lučenje ATP-a iz NCI-H292 stanica u odnosu na netretirane stanice prisutno je kod tretiranja s 2,5 % CSE-om nakon 1 sat za 10000 stanica, 15 % CSE-om nakon 1 sata za 5000 i 10000 stanica, te nakon 24 sata za 10000 stanica.

- 15 % CSE kod NCI-H292 stanica uzrokuje smanjenje ukupne koncentracije ATP-a u odnosu na netretirane stanice nakon 1 sata za 1000 stanica, 2 sata za 1000 i 5000 stanica, 4 sata za 1000 i 5000 stanica i 24 sata za 1000, 5000 i 10000 stanica. 2,5 % CSE je smanjio ukupnu koncentraciju ATP-a samo nakon 24 sata za 1000 i 5000 stanica. Ovi rezultati ukazuju na moguću citotoksičnost CSE-a.

6. LITERATURA

Aryal S, Diaz-Guzman E, Mannino DM, Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2014, 9, 1145-1154.

Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Sasakawa C. Cell death and infection: A double-edged sword for host and pathogen survival. *Journal of Cell Biology*, 2011, 195(6), 931-942.

Baxter M. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette-smoke triggered ATP release in the lung. *Thorax*, 2014, 69, 1080-1089.

Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflamation. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7, 99-109.

Brunssen C, Giebe S, Hofmann A, Brux M, Morawietz H. Evaluation of Cytotoxic, Oxidative, and Pro-Inflamamatory of Aqueous Cigarette Smoke Extract on Human Monocytes: A Potential Model System for Assessment of Next-Generation Tobacco and Nicotine Products. *Applied in Vitro Toxicology*, 2017, 3(1), 121-130.

Burtis CA, Bruns DE. Tietz fundametals of clinical chemistry and molecular diagnostics. St. Louis, Elsevier Saunders, 2015, str. 146, 147.

Campwala H, Fountain SJ. Constitutive and agonist stimulated ATP secretion in leukocytes. *Communicative & Integrative Biology*, 2013, 6(3), 23631.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica- Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 300, 301.

Decramer M, Janssens W, Miravitlles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 2012, 379(9823), 1341-1351.

Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Bruselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research*, 2006, 7, 53.

Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection*, 2009, 11(13), 1050-1062.

Fenila J, Perez Novo C, Bachert C, Van Crombruggen K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signalling*, 2013, 9(3), 285-306.

Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflamation. *Internation Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2011, 6, 413-421.

Giffard RG, Ru-Quan H, Emery JF, Duan M, Pittet JF. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia- the complex roles of Heat Shock Protein 70. *Anesthesiology*, 2008, 109(2), 339-348.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, managment, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2018., www.goldcopd.org, pristupljeno 03.04.2018.

Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases- A comprehensive approach. 2007., www.who.int, pristupljeno 03.04.2018.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija- udžbenik. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 23.

Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 2014, 509, 310-317.

Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 79(3), 425-434.

Lopez- Campos JL, Tan W, Soriano JB. Global burden of COPD. *Respirology*, 2016, 21, 14-23.

Luppi F, Aarbiou J, van Wetering S, Rahman I, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione. *Respiratory Research*, 2005, 6, 140.

MacNee W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Procedings of the American Thoracic Society*, 2005, 2, 258-266.

Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet*, 2007, 370(9589), 765-773.

Lee MS, Park WS, Kim YH, Ahn WG, Kwon SH, Her S. Intracellular ATP Assay of Live Cells Using PTD-Conjugated Luciferase. *Sensors*, 2012, 12(11), 15628-15637.

Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T, Glass K, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AMK. Mitophagy- dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(9), 3987-4003.

Opitz B, Van Laak V, Eitel J, Sutorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(12), 1294-1309.

PerkinElmer, ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System, Technical Manual, 2015, https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN-ATPlite.pdf, pristupljeno 14.05.2018.

Phillips J, Klauss B, Richter A, Massey ED. Exposure of Bronchial Epithelial Cells to Whole Cigarette Smoke: Assessment of Cellular Responses. *Alternatives to Laboratory Animals*, 2005, 33, 239-248.

Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010, 2010, 672395.

Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet*, 2003, 362(9382), 469-476.

Praetorius HA, Leipziger J. ATP release from non-excitable cells. *Purinergic Signalling*, 2009, 5, 433.

Rajendran M, Dane E, Conley J, Tantama M. Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). *The Biological Bulettin*, 2016, 231(1), 73-84.

Soriano JB, Zielinski J, Price D. Screening for and early detection of chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet*, 2009, 374(9691), 721-732.

Vanden Berghe T, Linkerman A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(2), 135-147.

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecuar mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11, 700-714.

Vande Walle L, Lamkanfi M. Pyroptosis. *Current Biology*, 2016, 26(13), 568-572.

Venereau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6, 422.

Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Necrotic Cell Death. *Current Molecular Medicine*, 2008, 8, 207-220.

Wang H, Word B, Lyn-Cook Jr L, Yang M, Hammons G, Lyn-Cook B. Cytotoxicity of Chronic Exposure to 4 Cigarette Smoke Condensates in 2 Cell Lines. *International Journal of Toxicology*, 2015, 34(2), 184-194.

Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research*, 2015, 2, 12.

Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling*, 2012, 8(3), 437-502.

Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkerman A, Ma D. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death & Disease*, 2015, 6(11), 1975.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Kronična izloženost dimu cigareta oštećuje epitel dišnih putova, što dovodi do aktivacije signalnih kaskada koje potiču otpuštanje upalnih citokina, proteolitičkih enzima i reaktivnih kisikovih spojeva koji uzrokuju dodatna oštećenja. Adenozin-trifosfat (ATP) u stanici je snižen kod nekroznog umiranja stanica, dok se ATP izlučen iz stanica smatra molekularnim obrascem oštećenja i potiče upalne odgovore u stanicama. Cilj istraživanja bio je ispitati utječe li dim cigareta na koncentraciju ATP-a, odnosno preživljavanje stanica, u NCI-H292 i THP-1 staničnim linijama te potiče li lučenje ATP-a u izvanstanični prostor. Luminometrijskom metodom je izmjerena koncentracija ukupnog i izvanstaničnog ATP-a. Kako su koncentracije eATP-a jako niske, koncentracije dobivene za ukupni ATP ukazuje na promjene unutarstaničnih koncentracija ATP-a.

15 % CSE uzrokovao je smanjenu ukupnu koncentraciju ATP-a u NCI-H292 stanicama u svim vremenskim točkama za 1000 stanica, nakon 2, 4 i 24 h za 5000 stanica te nakon 24 h za 10000 stanica. 2,5 % CSE smanjio je koncentraciju ukupnog ATP-a samo nakon 24 h. 15 % CSE potaknuo je značajno lučenje ATP-a izvan stanica nakon 1 h za 5000 i 10000 stanica, te nakon 24 h za 10000 stanica, dok je 2,5 % CSE uzrokovao značajno lučenje ATP-a samo za 10000 stanica tretiranih 1 h.

THP-1 stanice tretirane s 5 % CSE-a pokazale su smanjenu koncentraciju ukupnog ATP-a za 10000 stanica nakon 4 h, a tretiranje s 2,5 % i 5 % CSE nakon 24 h za 10000, 25000 i 50000, odnosno 25000 i 50000 stanica. 2,5 % CSE je kod THP-1 stanica doveo do povećanja koncentracije ATP-a kod 50000 stanica nakon 4 h, a 5 % CSE nakon 2 h za 10000 stanica. Povećanje koncentracije izvanstaničnog ATP-a 5 % CSE potaknuo je za 10000 stanica nakon 4 h, a 2,5 % i 5 % CSE za 25000 nakon 1 h.

Kod obje vrste stanica tretiranje tijekom dužeg vremena dovodi do smanjenja koncentracije izvanstaničnog ATP-a, što je vjerojatno uzrokovano aktiviranjem ATP-aza.

Učinak CSE-a na koncentraciju unutarstaničnog i izvanstaničnog ATP-a ovisi o njegovoj koncentraciji, vremenu izloženosti stanica CSE-u, te o vrsti i broju stanica. Povećanje unutarstaničnog ATP-a ukazuje na proliferacijski učinak CSE-a, smanjenje unutarstaničnog ATP-a ukazuje na citotoksičnost CSE-a, a povećanje izvanstaničnog ATP-a ukazuje na upalno djelovanje CSE-a.

Chronic exposure to cigarette smoke damages airways epithelia leading to activation of signaling cascades that promote the release of pro-inflammatory cytokines, proteolytic enzymes and reactive oxygen species that cause additional damage. Cellular adenosine triphosphate (ATP) is reduced during necrosis, while the ATP secreted from cells is considered as damage-associated molecular pattern who promotes inflammatory responses of cells. The aim of this study was to explore if cigarette smoke has an effect on ATP intracellular concentration as well as if it promotes ATP release from NCI-H292 or THP-1 cells to extracellular milieu. Luminometric method was used to measure concentration of total and extracellular ATP. Because eATP concentration is very low, concentration obtained for total ATP mirror the changes of intracellular ATP concentration.

15% CSE caused a reduced total ATP concentration in NCI-H292 cells in all time points for 1000 cells, after 2, 4 and 24 h for 5 000 cells and after 24 h for 10 000 cells. 2.5% CSE decreased total ATP concentrations only after 24 h. 15% CSE induced significant ATP release from cells after 1 h for 5 000 and 10 000 cells, and after 24 h for 10 000 cells, while 2.5% CSE caused significant ATP secretion only for 10 000 cells when applied for 1 h.

THP-1 cells treated with 5% CSE showed a decreased concentration of total ATP for 10 000 cells after 4 h and treatment with 2.5% and 5% CSE after 24 h for 10 000, 25 000 and 50 000, 25 000 and 50 000 respectively. 2.5% CSE in THP-1 cells resulted in an increase in ATP concentration for 50 000 cells after 4 h and 5% CSE after 2 h with 10 000 cells. 5% CSE stimulated increase in extracellular ATP concentration at 10 000 cells after 4 h, while 2.5% and 5% CSE caused significant increase of eATP at 25 000 cells after 1 h.

In both cell lines longer treatment leads to a reduction of the extracellular ATP concentration, which is probably caused by the activation of ATPases.

The effect of CSE on the concentration of intracellular and extracellular ATP depends on its concentration, duration of cell exposure to CSE, cell type and cell number. Increase in intracellular ATP indicates the proliferative effect of CSE, decrease in intracellular ATP indicates cytotoxicity of CSE, while increase in extracellular ATP indicates the pro-inflammatory effect of CSE.

8. PRILOZI

8.1 Popis kratica

AATD	deficijencija α-1 antitripsina (*engl.* alpha-1 antitrypsin deficiency)
ADP	adenozin-difosfat
AMP	adenozin-monofosfat
ANOVA	test jednosmjerne analize varijanci (*engl.* One Way Analysis of Variance)
Apaf-1	čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze (*engl*. apoptotic protease activating factor-1)
ATP	adenozin-trifosfat
CAD	DNaza aktivirana kaspazama (*engl.* caspase activated DNase)
CARD	domena za aktivaciju i privlačenje kaspaza (*engl*. caspase activation and recruitment domain)
CD39	biljeg diferencijacije 39 (*engl*. cluster of differentiation 39)
CD73	biljeg diferencijacije 73 (*engl*. cluster of differentiation 73)
cIAP-1	stanični protein 1 koji inhibira apoptozu (*engl.* cellular inhibitor of apoptosis protein 1)
CSE	ekstrakt dima cigareta (*engl.* cigarette smoke extract)
CYD	cilindromatoza (*engl.* cylindromatosis)
DAMP	molekularni obrazac oštećenja (*engl*. damage-associated molecular pattern)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt (*engl*. death inducing signaling complex)
eHsp	izvanstanični Hsp
eATP	izvanstanični ATP
ENT	uravnotežujući prijenosnik nukleozida (*engl.* equilibrative nucleoside transporter)
ENTPD	ektonukleozid-trifosfat-difosfohidrolaza (*engl.* ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (*engl.* extracellular signal-regulated kinase)
FADD	protein koji sadrži domenu smrti, a povezan je s Fas-om (*engl.* Fas-associated death domain)
Hsp	protein toplinskog šoka (engl. heat shock protein)
ICAD	inhibitor DNaza aktivirane kaspazama (*engl.* inhibitor of caspase-activated DNAse)

IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza (*engl.* c-Jun N-terminal kinase)
KOPB	kronična opstrukcijska plućna bolest
LRR	područje bogato leucinom (*engl.* leucine-rich repeat)
MAPK	mitogenom aktivirana proteinska kinaza (*engl*. mitogen activated protein kinase)
MLKL	protein s inaktivnom kinaznom domenom koja je eksprimirana u različitim vrstama (*engl.* mixed lineage kinase domain-like protein)
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)
NLRP	NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu (*engl*. NOD-like receptor pyrin)
NLRP3	NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (*engl*. NOD-like receptor pyrin 3)
NOD	oligomerizacijska domena koja veže nukleotide (*engl.* nucleotide-binding oligomerization domain)
P2X7R	P2X7 receptor
P2Y2R	P2Y2 receptor
PMA	forbol 12-miristat-13-acetat
PYD	pirinska domena (*engl*. pyrin domain)
RIPK	serin/treonin protein kinaza koja stupa u interakciju s receptorom (*engl.* receptor-interacting serin/threonine-protein kinase)
RNS	reaktivni dušikovi spojevi (*engl.* reactive nitrogen species)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (*engl.* reactive oxygen species)
TAK1	kinaza 1 koju aktivira transformirajući čimbenik rasta β (*engl.* transforming growth factor-β-activated kinase 1)
TNF-α	čimbenik nekroze tumora α (*engl*. tumor necrosis factor-α)
UTP	uridin-trifosfat

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ EKSTRAKTA DIMA CIGARETA NA KONCENTRACIJU ATP-a U THP-1 I NCI-H292 STANIČNIM LINIJAMA

Mihael Selar

SAŽETAK

Kronična izloženost dimu cigareta oštećuje epitel dišnih putova, što dovodi do aktivacije signalnih kaskada koje potiču otpuštanje upalnih citokina, proteolitičkih enzima i reaktivnih kisikovih spojeva koji uzrokuju dodatna oštećenja. Adenozin-trifosfat (ATP) u stanici je snižen kod nekroznog umiranja stanica, dok se ATP izlučen iz stanica smatra molekularnim obrascem oštećenja i potiče upalne odgovore u stanicama. Cilj istraživanja bio je ispitati utječe li dim cigareta na koncentraciju ATP-a, odnosno preživljavanje stanica, u NCI-H292 i THP-1 staničnim linijama te potiče li lučenje ATP-a u izvanstanični prostor. Luminometrijskom metodom je izmjerena koncentracija ukupnog i izvanstaničnog ATP-a. Kako su koncentracije eATP-a jako niske, koncentracije dobivene za ukupni ATP ukazuje na promjene unutarstaničnih koncentracija ATP-a. 15 % CSE uzrokovao je smanjenu ukupnu koncentraciju ATP-a u NCI-H292 stanicama u svim vremenskim točkama za 1000 stanica, nakon 2, 4 i 24 h za 5000 stanica te nakon 24 h za 10000 stanica. 2,5 % CSE smanjio je koncentraciju ukupnog ATP-a samo nakon 24 h. 15 % CSE potaknuo je značajno lučenje ATP-a izvan stanica nakon 1 h za 5000 i 10000 stanica, te nakon 24 h za 10000 stanica, dok je 2,5 % CSE uzrokovao značajno lučenje ATP-a samo za 10000 stanica tretiranih 1 h. THP-1 stanice tretirane s 5 % CSE-a pokazale su smanjenu koncentraciju ukupnog ATP-a za 10000 stanica nakon 4 h, a tretiranje s 2,5 % i 5 % CSE nakon 24 h za 10000, 25000 i 50000, odnosno 25000 i 50000 stanica. 2,5 % CSE je kod THP-1 stanica doveo do povećanja koncentracije ATP-a kod 50000 stanica nakon 4 h, te 5 % CSE nakon 2 h za 10000 stanica. Povećanje koncentracije izvanstaničnog ATP-a 5 % CSE potaknuo je za 10000 stanica nakon 4 h, a 2,5 % i 5 % CSE kod 25000 nakon 1 h. Kod obje vrste stanica tretiranje tijekom dužeg vremena dovodi do smanjenja koncentracije izvanstaničnog ATP-a, što je vjerojatno uzrokovano aktiviranjem ATP-aza. Učinak CSE-a na koncentraciju unutarstaničnog i izvanstaničnog ATP-a ovisi o njegovoj koncentraciji, vremenu izloženosti stanica CSE-u, te o vrsti i broju stanica. Povećanje unutarstaničnog ATP-a ukazuje na proliferacijski učinak CSE-a, smanjenje unutarstaničnog ATP-a ukazuje na citotoksičnost CSE-a, a povećanje izvanstaničnog ATP-a ukazuje na upalno djelovanje CSE-a.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 7 grafičkih prikaza i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ATP, ekstrakt dima cigareta, THP-1, NCI-H292

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. Andrea Hulina Tomašković, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sanja Dabelić, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EFFECT OF CIGARETTE SMOKE EXTRACT ON THE ATP CONCENTRATION IN THP-1 AND NCI-H292 CELL LINES

Mihael Selar

SUMMARY

Chronic exposure to cigarette smoke damages airways epithelia leading to activation of signaling cascades that promote the release of pro-inflammatory cytokines, proteolytic enzymes and reactive oxygen species that cause additional damage. Cellular adenosine triphosphate (ATP) is reduced during necrosis, while the ATP secreted from cells is considered as damage-associated molecular pattern who promotes inflammatory responses of cells. The aim of this study was to explore if cigarette smoke has an effect on ATP intracellular concentration as well as if it promotes ATP release from NCI-H292 or THP-1 cells to extracellular milieu. Luminometric method was used to measure concentration of total and extracellular ATP. Because eATP concentration is very low, concentration obtained for total ATP mirror the changes of intracellular ATP concentration. 15% CSE caused a reduced total ATP concentration in NCI-H292 cells in all time points for 1000 cells, after 2, 4 and 24 h for 5 000 cells and after 24 h for 10 000 cells. 2.5% CSE decreased total ATP concentrations only after 24 h. 15% CSE induced significant ATP release from cells after 1 h for 5 000 and 10 000 cells, and after 24 h for 10 000 cells, while 2.5% CSE caused significant ATP secretion only for 10 000 cells when applied for 1 h. THP-1 cells treated with 5% CSE showed a decreased concentration of total ATP for 10 000 cells after 4 h and treatment with 2.5% and 5% CSE after 24 h for 10 000, 25 000 and 50 000, 25 000 and 50 000 respectively. 2.5% CSE in THP-1 cells resulted in an increase in ATP concentration for 50 000 cells after 4 h and 5% CSE after 2 h with 10 000 cells. 5% CSE stimulated increase in extracellular ATP concentration at 10 000 cells after 4 h, while 2.5% and 5% CSE caused significant increase of eATP at 25 000 cells after 1 h.
In both cell lines longer treatment leads to a reduction of the extracellular ATP concentration, which is probably caused by the activation of ATPases. The effect of CSE on the concentration of intracellular and extracellular ATP depends on its concentration, duration of cell exposure to CSE, cell type and cell number. Increase in intracellular ATP indicates the proliferative effect of CSE, decrease in intracellular ATP indicates cytotoxicity of CSE, while increase in extracellular ATP indicates the pro-inflammatory effect of CSE.

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

Thesis includes: 38 pages, 7 figures and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ATP, cigarette smoke extract, THP-1, NCI-H292

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

Andrea Hulina Tomašković, **Ph.D.** *Senior Assistant*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Sanja Dabelić, **Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July2018.