

Djelovanje izvanstaničnog Hsp70 i ekstrakta dima cigareta na aktivaciju protein-kinaza aktiviranih mitogenom te na ekspresiju receptora 2 sličnog Tollu u unutarstaničnog Hsp70

Žrvnar, Ida

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:633568>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ida Žrvnar

**Djelovanje izvanstaničnog Hsp70 i ekstrakta
dima cigareta na aktivaciju protein-kinaza
aktiviranih mitogenom te na ekspresiju receptora
2 sličnog Tollu i unutarstaničnog Hsp70**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

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 svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na svojoj pruženoj pomoći i svim odgovorenim pitanjima. Posebno se zahvaljujem dr. sc. Aniti Somborac Bačuri te mentorici i profesorici Ladi Rumori na svom strpljenju, savjetima i pomoći pri izradi diplomskog rada. Zahvaljujem se svojoj obitelji, Boni, Vlasti, Petri i posebno Ivanu, bez čije bih ljubavi i potpore puno teže ovaj rad završila. Na kraju, zahvaljujem se svojim prijateljima što su uvijek bili tu za mene i zbog kojih su ove godine studiranja prošle puno brže nego što sam ikad mogla zamisliti.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB).....	1
1.1.1. Patogeneza KOPB-a.....	1
1.1.2. Uzroci KOPB-a.....	2
1.1.3. Oksidacijski stres	3
1.2. Apoptoza	4
1.3. Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK).....	6
1.4. Proteini toplinskog šoka (Hsp).....	6
1.5. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRR)	7
1.6. Receptori slični Tollu (TLR)	9
1.7. Signalni put receptora TLR.....	10
1.8. Djelovanje LTA i LPS-a na TLR2 i TLR4 receptore	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Priprema ekstrakta dima cigareta.....	13
3.2. Uzgoj stanica.....	13
3.2.1 16HBE.....	13
3.2.2. NHBE.....	14
3.3. Tretiranje stanica.....	15
3.3.1. 16HBE.....	15
3.3.2. NHBE.....	15

3.4. MTS test.....	15
3.5. Western blot analiza.....	16
3.6. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR).....	20
3.7. Statistička obrada podataka.....	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Ispitivanje citotoksičnosti MTS testom vijabilnosti	23
4.2. Ispitivanje aktivacije MAPK i ekspresije unutarstaničnog Hsp70 Western blot tehnikom	26
4.3. Ekspresija receptora TLR2 određena qPCR-om.....	35
5. RASPRAVA	37
6. ZAKLJUČCI.....	41
7. LITERATURA	42
8. SAŽETAK / SUMMARY.....	52
9. PRILOZI	56
9.1 Popis kratica.....	56

1. UVOD

1.1. Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB)

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB) definirana je postojanim respiracijskim simptomima i bronhoopstrukcijom, a predstavlja bolest dišnih putova. Trenutačno je četvrti po redu vodeći uzročnik smrti u svijetu, a smatra se da će starenjem populacije i sve većom izloženošću rizičnim čimbenicima do 2020. godine doći na treće mjesto (Lozano i sur., 2012). Mnoge osobe boluju od ove bolesti, a 2012. godine 3 milijuna ljudi je preminulo od KOPB-a ili komplikacija uzrokovanih KOPB-om. Bolest karakterizira kronična upala dišnih putova koja za posljedicu ima sužavanje malih dišnih putova, uništavanje plućnog parenhima i smanjenje plućne elastičnosti, što dovodi do nastanka simptoma karakterističnih za KOPB koji uključuju dispneju, otežano disanje, te kronični kašalj (s ili bez stvaranja sputuma). Strukturne promjene dišnih putova, koje se najčešće povezuju sa značajnom izloženošću dišnih putova štetnim česticama i plinovima, između ostaloga smanjuju sposobnost normalnog izdaha zraka. Budući da je KOPB jedan od glavnih razloga kroničnog morbiditeta i mortaliteta, ona ujedno predstavlja i veliki izazov javnozdravstvenom sustavu (Mathers i Loncar, 2006).

1.1.1. Patogeneza KOPB-a

Nekoliko mehanizama pridonosi patogenezi KOPB-a. Udisanje štetnih čestica, poput dima cigareta, uzrokuje infiltraciju upalnih stanica u dišne putove i pluća, što dovodi do kronične upale. Različite upalne stanice kao što su makrofagi, neutrofili i CD8⁺ T-limfociti sudjeluju u upalnome odgovoru u dišnim putovima osoba koje boluju od KOPB-a (Barnes i sur., 2003).

Do nastanka bolesti može doći i zbog poremećaja ravnoteže između proteolitičkih i anti-proteolitičkih molekula u plućima, što je primijećeno kod bolesnika s KOPB-om kod kojih je povećana proteolitička aktivnost. Ta povećana proteolitička aktivnost uzrokuje uništavanje zdravog plućnog parenhima što dovodi do razvoja emfizema. Do povećane proteolitičke aktivnosti može doći zbog upale, odnosno otpuštanja proteolitičkih enzima od strane upalnih stanica kao što su makrofagi i neutrofili. U njoj podlozi, isto tako mogu biti i genski čimbenici kao što je nedostatak alfa-1-antitripsina (Demedts i sur., 2005).

Još jedan mehanizam uključen u nastajanje KOPB-a je oksidacijski stres. Oksidacijski stres nastaje kao posljedica nastanka previše reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, *eng. reactive*

oxygen species) ili zbog nedostatka antioksidansa. Neki od potencijalnih uzroka oksidacijskog stresa u gornjim dišnim putovima su dim cigareta i leukociti. Sam oksidacijski stres može dovesti do disfunkcije stanica i stanične smrti te može inducirati promjene u izvanstaničnom matriksu pluća. Isto tako, oksidansi pridonose upali tako da aktiviraju transkripcijski faktor nuklearnog faktora – κB (NF κB , *eng. nuclear factor- κB*) što za posljedicu ima poticanje transkripcije upalnih gena. U razvoju bolesti dolazi do različitih interakcija ova tri mehanizma. Također, neravnoteža između apoptoze i obnove strukturnih stanica u plućima može dovesti do oštećenja plućnog tkiva i nastanka emfizema (Barnes i sur., 2003).

1.1.2. Uzroci KOPB-a

Kompleksna međuigra dugoročne kumulativne izloženosti štetnim česticama i plinovima te kombinacija različitih genskih predispozicija smatra se podlogom razvoja KOPB-a.

Rizik razvoja KOPB-a pripisuje se najvećim dijelom dimu cigareta. Osobe koje konzumiraju cigarete imaju jače izražene respiracijske simptome, veću godišnju stopu smanjenja forsiranog izdisajnog volumena u prvoj sekundi (FEV₁) i veću smrtnost uzrokovanu KOPB-om od nepušača (Kohansal i sur., 2009). Kronična izloženost dimu cigareta oštećuje epitel dišnih putova što dovodi do aktivacije signalnih kaskada koje potiču otpuštanje upalnih citokina. Dolazi do privlačenja upalnih stanica i pojačavanja upalnog odgovora. Uz to, dim cigareta ograničava proces popravka alveola, što uzrokuje fibrozu (Decramer i sur., 2012; Baglolle i sur., 2008; Rumora i sur., 2008; Kode i sur., 2006).

Ostali rizični čimbenici uključuju izloženost različitim česticama zraka što uključuje organsku i anorgansku prašinu, pare i plinove na radnom mjestu, smog te ostale zagađivače zraka. U zemljama u razvoju veliki rizik predstavlja izloženost zraku nastalom izgaranjem biomase u slabo ventiliranim zatvorenim prostorima, budući da se biomasa koristi za kuhanje i grijanje. Isto tako lošiji ekonomski uvjeti podrazumijevaju veću stopu pušenja, veću učestalost respiracijskih bolesti kao i slabiju dostupnost zdravstvene skrbi dovodeći do većeg rizika razvoja KOPB-a (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2019; Adeloye i sur., 2015; Vestbo, 2014).

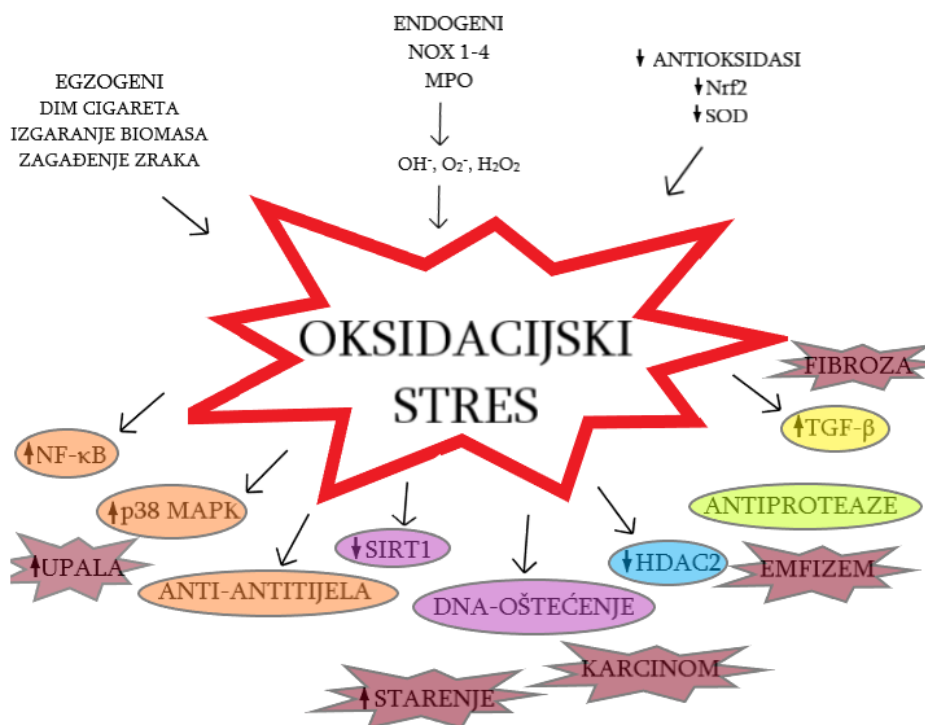
Iako neka istraživanja pokazuju povećanu osjetljivost žena na cigaretni dim (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2019; Han i sur., 2010), prevalencija KOPB-a je podjednaka u muškaraca i žena.

Složena interakcija okolišnih i genskih čimbenika u konačnici rezultira KOPB-om, no dosadašnja istraživanja povezanosti genskih čimbenika i KOPB-a nisu dala dosljedne rezultate (Diaz-Guzman i Mannino, 2014; Molfino, 2007; Wood i Stockley, 2006).

Druge bolesti, kao što su kronični bronhitis i astma, također povećavaju rizik od KOPB-a, ali na razvoj bolesti mogu utjecati i svi ostali čimbenici koji utječu na razvoj pluća za vrijeme trudnoće i djetinjstva (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2019; Postma i Rabe, 2015; Diaz-Guzman i Mannino, 2014).

1.1.3. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres smatra se jednim od najbitnijih čimbenika KOPB-a. Do njega dolazi zbog nedostatka antioksidacijske zaštite uslijed prekomjerne proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, eng. *reactive oxygen species*). Njihovi štetni učinci uključuju oštećenje lipida, proteina i DNA. U dišnim putovima osoba oboljelih od KOPB-a aktivirani neutrofili, makrofagi te epitelne stanice odgovorne su za proizvodnju ROS-a. Kao posljedica oksidacijskog stresa dolazi do oksidacije arahidonske kiseline te nastajanja izoprostana koji uzrokuju bronkokonstrikciju. Isto tako, oksidacijski stres ima široku lepezu učinka na dišne putove i parenhim zbog toga što povećava upalni odgovor (Slika 1). U osoba oboljelih od KOPB-a postoje dokazi o sistemskom oksidacijskom učinku do čijeg povećanja dolazi za vrijeme akutnih eksacerbacija (Barnes, 2014).



Slika 1. Do povećanja oksidacijskog stresa u KOPB-u može doći zbog poremećaja pravilne aktivacije transkripcijskog faktora 2 povezanog s NF-E2 (Nrf2, eng. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), aktivacije NADPH oksidaza (NOX, eng. *NADPH oxidases*), te smanjenja ekspresije superoksid dismutaze (SOD, eng. *superoxid dismutase*). Oksidacijski stres potiče aktivaciju upalnog transkripcijskog faktora nuklearnog faktora – κ B (NF κ B, eng. *nuclear factor- κ B*), p38 protein-kinazu aktiviranu mitogenom (MAPK, eng. *mitogen-activated protein kinase*), proizvodnju autoantitijela na karbonilatne proteine, smanjuje ekspresiju i aktivnost sirtuin-1 (SIRT1) te oštećuje DNA. Isto tako smanjuje ekspresiju i aktivnost histon-deacetilaze (HDAC-2), te povećava aktivnost transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β , eng. *transforming growth factor beta*). Zbog toga se oksidacijski stres smatra jednim od glavnih pokretača KOPB-a (Barnes, 2014).

1.2. Apoptoza

Apoptoza je visoko regulirani mehanizam stanične smrti. Ovako programirana stanična smrt dozvoljava uklanjanje neželjenih, oštećenih ili zaraženih stanica. Do sada su opisana tri različita signalna puta koja sudjeluju u staničnoj smrti. Kaspaze, proteini koji sudjeluju u

regulaciji apoptoze, uključene su u različite putove apoptoza (Degterev i sur., 2003). Vanjski put receptora smrti signalni je put koji se aktivira kao odgovor na izvanstanične signale te je posredovan vezanjem članova porodice čimbenika tumorske nekroze (TNF, eng. *tumor necrosis factor*), npr. TNF- α , na receptore smrti na površini stanice. Vezanje TNF-a dovodi do multimerizacije receptora smrti i nastanka signalnog kompleksa koji inducira smrt (DISC, eng. *death inducing signalling complex*). DISC sadrži različite adaptorske molekule, uključujući i domen smrti povezanu s Fas-om (FADD, eng. *Fas associated death domain*). FADD potom aktivira kaspazu-8, -2, -10 koje aktiviraju kaspazu-3, a ona izvršava apoptozu tako da oslobađa Dnaze aktivirane kaspazama (CAD, eng. *caspase-activated Dnase*) od njihovih inhibitora, što za posljedicu ima fragmentaciju DNA (Yamamoto i sur., 2002; Scaffidi i sur., 1998; Tang i Kidd, 1998; Muzio i sur., 1996).

Unutarnji mitohondrijski put odgovor je na fizičke i kemijske signale stresa te dovodi do otpuštanja citokroma c iz mitohondrija. Citokrom c aktivira čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze 1 (Apaf-1, eng. *apoptotic protease activating factor-1*) što aktivira kaspazu-9, koja potom aktivira kaspazu-3 te konačno započinje apoptozu (Slee i sur., 1999; Luo i sur., 1998; Li i sur., 1997; Zou i sur., 1997).

U Endoplazmatskom signalnom putu kaspazu-12 aktiviraju stresni signali kao što je hipoksija (Szegezdi i sur., 2003; Rao i sur., 2001).

Proteaze koje nisu kaspaze isto tako mogu izravno aktivirati kaspaze, primjerice granzim B koji aktivira kaspazu-3 (Darmon i sur., 1995). Apoptozu može inducirati i nedostatak signala preživljavanja, kao npr. nedostatak čimbenika rasta. U takvim slučajevima dolazi do otpuštanja citokroma c iz mitohondrija koji potom pokreće apoptozu (Vander Heiden i sur., 2001; Eastman, 1995).

Dok je apoptoza veoma regulirani aktivni mehanizam stanične smrti, stanična nekroza je nekontrolirani proces u kojem sama stanica ni na koji način ne sudjeluje (Lockshin i Zakeri, 2001). Zbog toga je nekrozu teško spriječiti, međutim apoptoza je proces koji se može modulirati u cilju održavanja stanične vijabilnosti.

Posljedično, apoptoza je veoma bitna u održavanju normalne stanične homeostaze zbog doprinosa ravnoteži između stanične proliferacije i diferencijacije te uklanjanja stanica koje više nisu potrebne. Poremećaj ravnoteže između proliferacije i apoptoze u plućnom tkivu doprinosi patogenezi KOPB-a. Rezultati dobiveni na životinjskim modelima ukazuju na povezanost između dima cigareta i apoptoze te razvoja emfizema, ali je broj sličnih istraživanja u ljudi ograničen. (Demedts i sur., 2006).

1.3. Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK)

Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) su regulacijski proteini pronađeni u svim eukariotskim stanicama. Aktiviraju se raznim signalnim putovima kao odgovor na izvanstanične stimulanse. U sisavaca je karakterizirano pet velikih skupina MAPK, dok su tri češće istraživane skupine kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1 i 2 (ERK1/2, eng. *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*), kinaze koje fosforiliraju N-terminalni dio transkripcijskog faktora c-Jun-a (JNK, eng. *c-Jun N-terminal kinases*) i p38 kinaze. ERK1 i ERK2 se uglavnom aktiviraju kao odgovor na čimbenike rasta, dok na aktivaciju p38 i JNK najviše utječu čimbenici stresa koji uključuju stimulaciju citokinima, ionizirajuće zračenje i osmotski šok. MAPK se aktiviraju dvostrukom fosforilacijom treoninskih i tirozinskih ostataka koji se nalaze u aktivacijskoj omći poddomene VIII. Tako aktivirane MAPK fosforiliraju brojne transkripcijske faktore, kao npr. c-Jun i NF-κB, koji vezanjem na DNA potiču transkripciju i sintezu različitih upalnih citokina kao i apoptoznih molekula (Roux i Blenis, 2004; Kawai i Akira, 2006; Takeda i Akira, 2005).

1.4. Proteini toplinskog šoka (Hsp)

Proteini toplinskog šoka (Hsp, eng. *heat shock proteins*) evolucijski su veoma konzervirani. Spadaju u skupinu stresnih proteina te se mogu pronaći u stanicama različitih organizama, od bakterija do sisavaca (Borges i sur., 2012). Njihovi geni u svojoj promotorskoj regiji sadrže elemente toplinskog šoka (HSE, eng. *heat shock elements*), a njihovu transkripciju potiču transkripcijski faktori toplinskog šoka (HSF, eng. *heat shock factors*) (Sharp i sur., 2013). Iako su dobili ime zbog toga što se mogu inducirati toplinom, na povećanu transkripciju Hsp-a najčešće utječe stanični stres, koji osim topline uključuje i ultraljubičasto zračenje, oksidacijski stres, te virusne infekcije (Kalmar i Greensmith, 2009). Njihova najbitnija uloga u stanici je ona molekuskog šaperona te kao takvi sudjeluju u sastavljanju, stabilizaciji, smotavanju i translociranju različitih proteina. Isto tako, Hsp proteini imaju bitnu ulogu u poticanju razgradnje oštećenih proteina te regulaciji staničnog odgovora. Na taj način ovi proteini doprinose održavanju homeostaze stanica i tkiva. Proteini toplinskog šoka podijeljeni su na temelju njihovih molekulskih masa (prema kojima nose i ime) u pet porodica: mali Hsp proteini, Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp110. Sadrže dvije funkcionalno značajne domene, domenu koja veže supstrat i domenu koja veže ATP, budući da su svi Hsp-ovi, osim malih Hsp proteina, ovisni o ATP-u (Pockley, 2003).

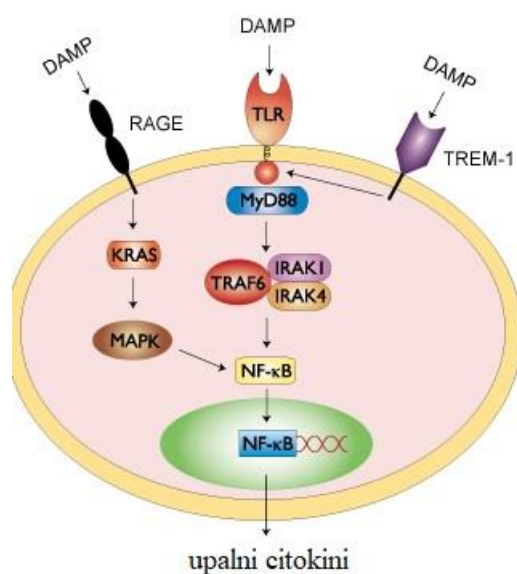
Porodica Hsp70 uključuje najpoznatije i najviše konzervirane proteine toplinskog šoka koji mogu biti inducibilni ili konstitutivno eksprimirani. Većina njih, kao što je inducibilni Hsp70, nalazi se u citosolu, ali pripadnici ove porodice pronađeni su i u mitohondrijima te endoplazmatskom retikulumu. Kao proteini koji inhibiraju staničnu smrt, ovisnu i neovisnu o kaspazama, Hsp imaju veoma snažno antiapoptozno djelovanje. Inhibicijom NF- κ B signalnog puta sprječavaju odgovor stanice na upalne citokine te na taj način sudjeluju u regulaciji imunskog odgovora (Sevin i sur., 2015).

Za razliku od unutarstaničnog Hsp70, izvanstanični Hsp70 vezanjem na površinske receptore slične Tollu (TLR, eng. *Toll-like receptor*), TLR2 i TLR4, u imunskim stanicama aktivira NF- κ B signalni put te potiče sintezu i izlučivanje upalnih citokina, modulirajući na taj način imunski odgovor. Izvanstanični Hsp70 može potjecati iz živih stanica bez da je prisutno tkivno oštećenje ili stanično umiranje, ali točan mehanizam izlaska Hsp70 proteina iz takvih stanica još nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se, doduše, da u izlasku proteina Hsp70 iz stanice posreduju egzosomi, odnosno membranski vezane vezikule koje sadrže različite stanične proteine. Ukoliko izvanstanični Hsp70 potječe iz žive stanice, pretpostavlja se da ima regulacijsku ulogu. S druge strane, ako izvanstanični Hsp70 potječe iz mrtve stanice, on iz nje izlazi uslijed jakih oštećenja i pucanja stanične membrane te djeluje kao signal opasnosti (Sevin i sur., 2015; Han i sur., 2009). Povišena koncentracija Hsp70 u plazmi prisutna je u različitim upalnim bolestima, među kojima je i KOPB (Qu i sur., 2015).

1.5. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRR)

Plućni epitel, zajedno s mijeloidnim stanicama i pripadajućim limfatičkim tkivom bogat je velikim brojem visoko očuvanih, receptora za obrasce (PRR, eng. *Pattern recognition receptors*). Oni su veoma važni u brzom odgovoru na akutnu upalu. Njihovom aktivacijom dolazi do otpuštanja citokina i kemokina koji privlače leukocite na mjesto upale te potiču sazrijevanje antigen prezentirajućih stanica na taj način inducirajući stečenu imunost. Nastali imunski odgovor može biti koristan, ali i štetan za domaćina, što ovisi o opsegu imunskih reakcija kao i njihovom trajanju. Zbog njihove uloge u upalnome odgovoru pripisuje im se ključna uloga u raznim plućnim bolestima, uključujući i KOPB (Opitz i sur., 2010). PRR-i prepoznaju dvije vrste liganda. Prva vrsta liganada su molekularni obrasci povezani s patogenom (PAMP, eng. *pathogen associated molecular patterns*) koji su odgovorni za prepoznavanje različitih mikroorganizama. Molekularni obrasci povezani s oštećenjem (DAMP, eng. *damage associated molecular patterns*) su druga vrsta liganada koju PR receptori

mogu prepoznati. Oni uključuju molekulske strukture nastale oštećenjem koje se obično nalaze unutar stanice, a otpuštaju se tijekom staničnog stresa ili ozljede u izvanstanični okoliš (Bezemer i sur., 2012; Kant i sur., 2017; Lafferty i sur., 2010). Do sada je otkriveno nekoliko PRR (Slika 2), a to su: receptori slični Toll receptoru *Drosophila* vrste (TLR, eng. *Toll-like receptor*), receptori slični oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR, eng. *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor*), lektinski receptor tipa C (CLR, eng. *C-type lectin receptor*) i receptori slični genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (RLR, eng. *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor*) (Opitz i sur., 2010; Takeuchi i Akira, 2010).



Slika 2. DAMP molekule mogu se vezati za različite receptore za obrasce i potaknuti sintezu upalnih citokina.

Preuzeto iz: www.invivogen.com/review-damage-associated-molecular-patterns, 2017.

1.6. Receptori slični Tollu (TLR)

Receptori slični Toll-u, TLR su transmembranski proteini koji se mogu nalaziti na membranama unutar stanica (liposomima i endosomima) ili na staničnim membranama. Kod ljudi je do sada otkriveno 11 članova porodice. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11 su unutarstanični receptori smješteni na endosomima i lizosomima te uglavnom prepoznaju nukleinske kiseline mikroba (Yarovinsky, 2014; Opitz i sur., 2010; Takeda, 2004). S druge strane, receptori smješteni na staničnoj membrani, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, najčešće prepoznaju komponente mikrobnih staničnih stijenki i membrana. (Takeda i Akira, 2004; Takeda i sur., 2003). TLR-ovi u svojoj strukturi imaju izvanstaničnu domenu koja sadrži 16-28 područja bogatih leucinom (LRR, eng. *leucine-rich repeat*) te citoplazmatsku domenu homolognu Tollu i receptoru za interleukin-1 (TIR, eng. *Toll/interleukin 1 receptor homology domain*). Ovi receptori stvaraju heterodimere s drugim receptorima i koreceptorima da bi povećali svoju raznolikost i mogli vezati različite molekularne obrasce (Molteni i sur., 2016; Sandor i Buc, 2014).

Neke od komponenata dima cigareta mogu izravno djelovati na TLR-ove, ali i uzrokovati oštećenje epitelnih stanica. Tako oštećene stanice otpuštaju DAMP-ove koji mogu biti molekule kao što su fibrin, hem, oligosaharidni fragmenti hijaluronana, polisaharidni fragmenti heparan sulfata te Hsp60 i Hsp70. Vezanjem DAMP-ova na receptore TLR2 i TLR4 dolazi do aktivacije upalnog odgovora što pridonosi razvoju sterilne upale. Do egzacerbacije KOPB-a može doći uslijed infekcija dišnih putova budući da vezanjem PAMP-ova na receptore TLR2 i TLR4 dolazi do hipersekrecije mukozne, proliferacije fibroblasta i otpuštanja proteaza (Opitz et al., 2010;).

TLR2 i TLR4 najviše su proučavani TLR-ovi, a njihova glavna uloga je prepoznavanje komponente bakterijske stanične stijenke i membrane. TLR4 prvenstveno služi kao receptor za Gram-negativne bakterije te je njegov najbolje istražen ligand lipopolisahardi (LPS) iz vanjske membrane takvih bakterija. TLR2 dominantno funkcionira kao receptor za Gram-pozitivne bakterije i prepoznaje peptidoglikan, lipoproteine i lipoteikoičnu kiselinu (LTA, eng. *lipoteichoic acid*). Osim Gram pozitivnih bakterija, TLR2 prepoznaju i mikobakterijski lipoarabinomanan, kao i rijetke vrste LPS-a te lipoproteine koji potječu od različitih mikroorganizama koji uključuju gljivice (Chaudhuri i sur., 2007; Chaudhuri i sur., 2005;

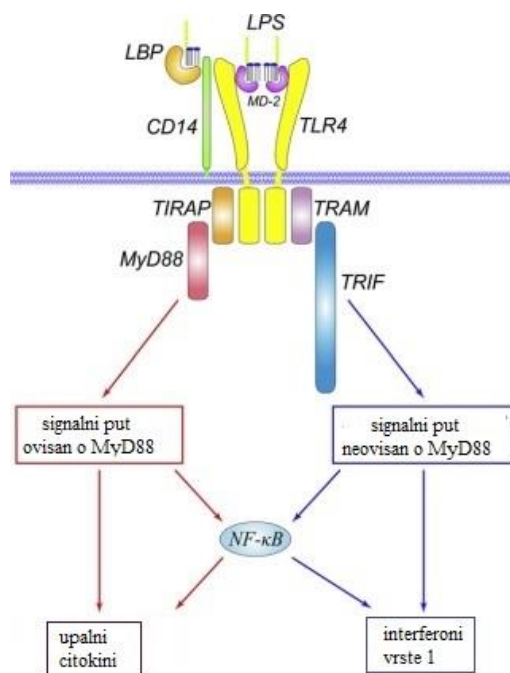
Takeda i sur., 2003). TLR4 i TLR2 pokazuju povećanu ekspresiju na uzorcima dišnih putova u pacijenata s KOPB-om u odnosu na zdravu populaciju (Kant i sur., 2017).

1.7. Signalni put receptora TLR

Biološki odgovor ovisi o vrsti receptora TLR koji se aktivira. Ti različiti odgovori objašnjeni su otkrićem TIR domena na koje se mogu vezati četiri različita tipa adaptacijskih molekula, koje uključuju: čimbenik mijeloidne diferencijacije 88 (MyD88, eng. *myeloid differentiation factor 88*), koji također posreduje i u signalizaciji receptora za IL-1 (IL-1R, eng. *interleukin-1 receptor*), adaptacijski protein sličan MyD88/adaptacijski protein s TIR domenom (Mal/TIRAP, eng. *MyD88 adaptor-like/TIR adaptor protein*), adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (TRIF, eng. *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- β*) i adaptacijski protein srodan TRIF-u (TRAM, eng. *TRIF-related adaptor molecule*). Za negativnu regulaciju signalnog puta ovisnog o TRIF-u odgovoran je protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (SARM, eng. *sterile-alpha and Armadillo motif containing protein*). Put ovisan o MyD88 adaptacijskoj molekuli dovodi do aktivacije NF- κ B i MAP kinaza. Receptor TLR3 je jedini do sada otkriveni receptor TLR koji koristi put neovisan o MyD88. On aktivira NF- κ B i MAPK signalne putove to dovodi do sinteze citokina preko TRIF-a (Kawai i Akira, 2010).

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

Bakterijski LPS izoliran iz stanične stijenke Gram negativnih bakterija inducira brojne upalne vazoaktivne gene koju uključuju endotelin-1, TNF- α , gen za sintazu II dušikovog oksida (NOS II, eng. *nitric oxide synthase II*), COX2, i druge. U prisutstvu seruma dolazi do značajnog povećanja djelovanja LPS-a, budući da je za njegovo prepoznavanje i prezentiranje TLR4 receptoru potreban serumski protein koji veže LPS (LPB, eng. *LPS-binding protein*) kao i CD14. Vezanje LPS-a za TLR4 receptor uzrokuje aktivaciju puta ovisnog o MyD88 i puta neovisnog o MyD88 preko TRIF adaptacijske molekule (Slika 3). Vezanjem na TLR receptore, LPS uzrokuje sličan tip upalnog odgovora kao i LTA, koja se nalazi u Gram-pozitivnim bakterijama. LTA će se vezati za kompleks TLR2/TLR6 uz pomoć CD36 (na jednak način na koji CD14 omogućava prezentiranje LPS-a TLR4 receptoru) te dovesti do aktivacije puta ovisnog o MyD88 (Mitchell i sur., 2007).



Slika 3. Vezanjem LPS-a na TLR4 receptor pokreće se signalna kaskada koja dovodi do povećane sinteze upalnih citokina i interferona.

Preuzeto iz: Lu i sur., 2008.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dim cigareta smatra se jednim od najbitnijih čimbenika rizika za razvoj KOPB-a. Proteini toplinskog šoka (Hsp) visoko su očuvana porodica proteina koji u stanici primarno djeluju kao molekulski šaperoni. Najviše je istražena Hsp70 porodica. Unutarstanični Hsp70 proteini djeluju antiapoptozno i protuupalno, ali izlaskom iz stanice potiču sintezu upalnih citokina i pridonose razvoju upale. Protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) aktiviraju se uslijed različitih bioloških odgovora stanice, što uključuje umiranje i upalu. Receptori TLR imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze pluća te su uključeni u regulaciju urođenog i stečenog imuniteta. LPS i LTA su bakterijske komponente Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija te aktivacijom receptora TLR uzrokuju sličan upalni odgovor. Smatra se da u osoba oboljelih od KOPB-a često dolazi do kronične kolonizacije dišnih putova koja zbog smanjene aktivacije receptora TLR može dovesti do egzacerbacija.

U ovome istraživanju ispitivali smo upalni i toksični učinak izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta (CSE), LPS-a i LTA-a na 16HBE i NHBE stanicama. 16HBE i NHBE stanice korištene su kao modeli za ispitivanje plućne komponente KOPB-a. Na 16HBE staničnoj liniji bilo je moguće ispitati različite kombinacije tretiranja, dok su se na primarnim NHBE stanicama mogla izvoditi samo pojedinačna tretiranja (zbog ograničenog dostupnog broja ovih stanica).

Ispitivalo se djeluju li navedena tretiranja toksično na način da se vijabilnost stanica odredila pomoću MTS testa. Ispitivanjem ekspresije mRNA za receptore TLR2 i TLR4 pomoću kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu željelo se utvrditi potiču li tretiranja upalni odgovor (ispitivanja na razini genske ekspresije). Western blot tehnikom utvrđena je aktivacija i ekspresija MAP kinaza, ekspresija unutarstaničnog Hsp70 te ekspresija receptora TLR2 i TLR4 (ispitivanja na razini proteinske ekspresije).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema ekstrakta dima cigareta

Ekstrakt dima cigareta (CSE, eng. *cigarette smoke extract*) je svježe pripremljen neposredno prije izvođenja svakog pokusa. Korištene su referentne cigarete 3R4F (Kentucky Tobacco Research & Development Center, University of Kentucky, Lexington, KY, USA). Prije pripremanja ekstrakta dima cigareta s cigareta su odrezani filteri te se dim dviju cigareta propuhao kroz 25 ml staničnog medija bez seruma uz upotrebu vakuumske pumpe. Tako nastali 100 % CSE standardizirao se mjerenjem apsorbancije CSE-a na 320 nm uz pomoć UV/VIS spektrofotometra (Cecil Aquarius CE 7200, Cecil Instruments). Apsorbancija svježe pripremljenog CSE-a za svaki nezavisni pokus odgovarala je vrijednostima dobivenim mjerenjem apsorbancija šest ekstrakata dima cigareta pripremljenih u tri uzastopna dana (Somborac-Baćura i sur., 2018). Za pokuse je korišten CSE razrijeđen sa staničnim medijem bez seruma unutar 30 minuta od pripreme.

3.2. Uzgoj stanica

3.2.1 16HBE

16HBE stanice su humana bronhijalna epitelna stanična linija izolirana iz pluća jednogodišnjeg muškog pacijenta. Stanice su imortalizirane SV40 plazmidom (pSVori-), pri čemu zadržavaju karakteristične značajke normalnih diferenciranih bronhijalnih epitelnih stanica.

Uzgajane su u EMEM mediju (Lonza Group Ltd., Švicarska) s 10 % FBS-a te 1 % antibiotika i antimikotika, u bocama za uzgoj staničnih kultura od 25 cm² prethodno obloženima s 3 mg/ml kolagenom (Inamed, SAD) te se nakon postignute konfluentnosti od oko 90 % nasađuju na odgovarajuće ploče s 24 jažica koje su također obložene na isti način kao i boce za uzgoj staničnih kultura.

16HBE stanice se nakon što postignu oko 90 % konfluentnosti isperu s 5 ml HBSS otopine (Lonza Group Ltd., Švicarska), zatim se dodaje 5 ml HBSS otopine i inkubiraju se 5-10 minuta na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂. Nakon toga odsiše se HBSS vakuum sisaljkom i

stanice se isperu s 1,5 ml 0,25 % otopine tripsin-EDTA, zatim im se ponovno dodaje 1,5 ml 0,25 % otopine tripsin-EDTA na 60 sekundi te se nakon toga ista odsiše vakuum sisaljkom. Nakon toga, stanice se inkubiraju 5-10 minuta na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂ kako bi se odvojile od podloge te im se dodaje 5 ml EMEM medija s FBS-om.

Stanice se dobro resuspendiraju te nasade na ploče s 24 jažice prethodno obložene kolagenom u koncentraciji 30-50000 stanica po jažici u 1 ml EMEM medija s 10 % FBS-a i 1 % antibiotika i antimikotika. Nakon što stanice postignu oko 95 % konfluentnosti promijeni se medij u EMEM bez FBS-a (Lonza Group Ltd., Švicarska) u kojem se inkubiraju preko noći prije izvođenja pokusa. Sva tretiranja na 16HBE stanicama vrše se u EMEM-u bez FBS-a.

3.2.2. NHBE

Normalne humane bronhijalne epitelne stanice (NHBE) izolirane su iz epitela dišnih putova iznad bifurkacije traheje zdravih ispitanika (Lonza Group Ltd., Švicarska).

Uzgajaju se u BEGM mediju (Lonza Group Ltd., Švicarska), u bocama za uzgoj staničnih kultura od 25 cm² prethodno obloženima 0,1 % fibronektinom (Sigma-Aldrich, SAD) i 3 mg/ml kolagenom (Inamed, SAD) te se odmah nakon postignute konfluentnosti od oko 90 % nasađuju na odgovarajuće ploče s 24 jažica koje su također obložene na isti način kao i boce za uzgoj staničnih kultura.

NHBE stanice se nakon što postignu oko 90 % konfluentnosti isperu dva puta s 5 ml HBSS otopine (Lonza Group Ltd., Švicarska) te im se dodaje 2 ml 0,25 % otopine tripsin-EDTA kako bi se odvojile od podloge. Nakon 5 minuta inkubacije na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂, na stanice se doda 2 ml fetalnog goveđeg seruma (FBS, eng. fetal bovine serum, Capricorn, USA) koji zaustavlja djelovanje tripsina te se stanice resuspendiraju pipetom. Stanična suspenzija prenese se u sterilnu epruvetu s čepom i centrifugira 5 minuta na 500 g pri sobnoj temperaturi. Nadsloj se ukloni vakuum sisaljkom, a talog stanica resuspendira u 1 ml BEGM medija. Odredi se broj stanica u suspenziji te se nasađuju na prethodno obložene ploče u koncentraciji 30-50000 stanica po jažici u 1 ml BEGM medija. Nakon što stanice postignu oko 95 % konfluentnosti promijeni se medij u BEBM (Lonza Group Ltd., Švicarska) s dodatkom 10 µg/ml transferina i 5 µg/ml inzulina (Sigma-Aldrich, SAD) te 1 % otopine antibiotika-antimikotika (TIPSA medij) u kojem se inkubiraju preko noći prije izvođenja pokusa. Sva tretiranja na NHBE stanicama vrše se u TIPSA mediju.

3.3. Tretiranje stanica

3.3.1. 16HBE

Stanice su tretirane s 0,3 i 1 µg/ml rekombinantnog humanog Hsp70 proteina (rhHsp70) sintetiziranog u bakteriji *E. coli*, s niskim sadržajem endotoksina (Enzo Life Sciences, SAD). Stanice su također tretirane s 0,1 µg/ml LPS-a i 1 µg/ml LTA te njihovim kombinacijama s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70. LPS je izoliran iz *E. Coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, SAD), a LTA iz *S. aureus* (Invivogen, Francuska). CSE je pripreman neposredno prije svakog pokusa te je razrijeđen s TIPSA medijem na 2,5 % i 15 % CSE unutar 60 minuta od pripreme (van der Toorn i sur., 2007). Stanice su tretirane s 2,5 % i 15 % CSE-om te njihovim kombinacijama s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70.

3.3.2. NHBE

Stanice su tretirane sa 0,3 i 1 µg/ml rekombinantnog humanog Hsp70 proteina (rhHsp70) sintetiziranog u bakteriji *E. coli*, s niskim sadržajem endotoksina (Enzo Life Sciences, SAD). Stanice su također tretirane s 0,1 µg/ml LPS-a i 1 µg/ml LTA. LPS je izoliran iz *E. Coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, SAD), a LTA iz *S. aureus* (Invivogen, Francuska). CSE je pripreman neposredno prije svakog pokusa te je razrijeđen s TIPSA medijem na 2,5 % i 15 % CSE unutar 60 minuta od pripreme (van der Toorn i sur., 2007). Stanice su tretirane s 2,5 % i 15 % CSE-om te njihovim kombinacijama s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70.

3.4. 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.

Nakon tretiranja stanica, u svaku jažicu se dodaje 20 µl MTS reagensa (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Wisconsin, SAD) bez prethodnog uklanjanja medija i stanice se inkubiraju tijekom 4 sata na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂.

Slijepa proba je kompletni RPMI medij. Apsorbancija se mjeri na 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR3 Multilabel Reader, PerkinElmer, Massachusetts, SAD).

Vijabilnost je izražena kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica naznačena je kao 100 %, a vrijednosti apsorbancija tretiranih uzoraka izražene su kao udio u odnosu na netretirane stanice. Rezultati su prikazani grafički kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica $\pm$ standardna pogreška (SEM).

3.5. Western blot analiza

Western blot analizom određena je aktivacija i ekspresija različitih MAPK te ekspresija Hsp proteina. Proteini iz staničnih lizata razdvojeni su okomitom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, eng. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) te su preneseni na nitroceluloznu membranu. Zatim je membrana zasićena puferom za blokiranje da bi se spriječilo nespecifično vezanje protutijela na membranu u daljnjim koracima analize. Nakon toga membrana je inkubirana s primarnim protutijelom koje specifično prepoznaje ciljni protein. Na primarna protutijela vezala su se sekundarna protutijela koja prepoznaju epitop na primarnom protutijelu, a na sebi imaju vezan enzim peroksidazu iz hrena. Taj enzim u prisustvu kemiluminiscentnog supstrata emitirao je svjetlo na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela na membrani te su se izlaganjem svjetlu u uređaju za fotografiranje membrana ta mjesta vidjela kao zatamnjene vrpce.

Stanični lizati pripremljeni su iz stanica uzgajanih u triplicatu na pločicama sa 6 jažica i tretiranih s CSE-om. Nakon tretiranja, stanice su isprane dva puta s hladnim PBS-om te lizirane pomoću pufera za liziranje stanica (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 % glicerol, 1 mM natrijev ortovanadat uz dodatak proteaznih inhibitora Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)) tijekom 20 min. Tako lizirane stanice centrifugirane su na 15000 g tijekom 20 min na 4 °C. U jednom dijelu dobivenog nadsloja određena je koncentracija proteina (metodom s BCA, eng. *bicinchoninic acid assay*), dok je u drugi dio nadsloja dodan 6 puta koncentrirani Laemmlijev pufer za nanošenje uzoraka (0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 12 % SDS, 30 % glicerol, 0,2 % bromfenol plavilo, 12 % β -merkaptioetanol u destiliranoj vodi). Uzorci su prokuhani na 97 °C tijekom 3 min, brzo ohlađeni na ledu i pospremljeni na -20 °C do korištenja za Western blot analizu.

Proteini iz staničnih lizata (40 µg) razdvojeni su okomitom diskontinuiranom elektroforezom SDS-PAGE. Za elektroforezu proteina korišten je 4 %-tni sabijajući gel te 10 %-tni razdvajajući gel. 4 %-tni sabijajući gel sastojao se od 6,1 ml ultračiste H₂O, 2,5 ml pufera za sabijanje (0,5 M Tris-HCl pH 6,8), 100 µl 10 % otopine SDS-a, 1,3 ml 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 µl 10 % otopine amonij-persulfata i 10 µl tetrametil-etilendiamina (TEMED). Za 10% razdvajajući gel korišteno je 4,35 ml ultračiste H₂O, 2,5 ml pufera za razdvajanje (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100 µl 10 % otopine SDS-a, 3,0 ml 30 % otopine akrilamid/bis-akrilamida, 50 µl 10 % otopine amonij-persulfata i 5 µl TEMED-a.

Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,25 M glicin, 0,1 % otopina SDS-a) uz napon od 100 V tijekom 1,5 h. Kao standard za približno određivanje molekulske mase proteina korišten je standard proteina koji je na gelu davao deset obojenih proteinskih vrpca u rasponu od 10 do 250 kDa (Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards, Bio Rad, SAD).

Elektroforezom razdvojeni proteini preneseni su na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 µm (GE Healthcare, SAD) u uređaju za elektro-prijenos proteina (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, SAD) pri jakosti struje od 250 mA tijekom 1,5 h. Da bi se provjerilo jesu li uzorci nanoseni na gel sadržavali jednaku koncentraciju proteina te je li postignuta ujednačenost prijenosa proteina na membranu, gelovi su bojani 0,1 % otopinom boje Coomassie briljant plavo R-250 u smjesi 40 % metanola i 10 % octene kiseline. Višak boje uklonjen je korištenjem otopine za odbojavanje (40 % metanola i 10 % octene kiseline u destiliranoj vodi). Ujednačenost prisustva proteina u različitim uzorcima odčitana je vizualno.

Nespecifično vezanje protutijela na slobodna mjesta na membrani spriječeno je inkubiranjem membrane u puferu za blokiranje. Kao pufer za blokiranje korišteno je 5 % obrano mlijeko u prahu u puferu za ispiranje (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20 u ultračistoj vodi) tijekom 1 h na sobnoj temperaturi.

Membrana je zatim inkubirana razrijeđenim primarnim protutijelom preko noći na +4 °C:

- za detekciju ukupnog proteina ERK korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara C-terminalnom aminokiselinskom slijedu ERK1 štakora, a koja detektiraju ERK1 i ERK2 kinazu (ERK 1 (C-16): sc-93, Santa Cruz

Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA));

- za detekciju dvojno-fosforiliranog ERK-a korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog područja aktivnih oblika ERK1 (Thr202 i Tyr204) i ERK2 (Thr185 i Tyr187) kinaza (Phospho p44/42 MAPK (ERK1/2) (D13.14.4E) XP Rabbit mAb, #8544, Cell Signaling Technology, SAD) (razrjeđenje 1:2000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju ukupnog proteina p38 korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram peptida koji odgovara C-terminalnom aminokiselinskom slijedu p38 miša (p38 α (C-20): sc-535; Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:800 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju dvojno-fosforilirane p38 korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram dvojno-fosforiliranog područja aktivnog oblika ljudske p38 kinaze (Thr80 i Tyr182) (Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP® RabbitmAb, #4511, Cell Signaling Technology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju TLR2 proteina korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram ostataka koji okružuju Val303 na ljudskom TLR2 proteinu (Toll-like Receptor 2 (D7G9Z) RabbitmAb, #12276, Cell Signaling Technologies, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju TLR4 proteina korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram aminokiselina 198 - 395 na mišjem TLR4 proteinu (TLR4 antibody (25), sc-293072, Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju Hsp70 proteina korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram nativnog ljudskog Hsp70 proteina (Hsp70/Hsp72, mAb (C92F3A-5), #ADI-SPA-810, Enzo Life Sciences, Švicarska) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju β -aktina korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram C-terminalnog ostatka ljudskog aktina (Actin (I19): sc-1616-R; Santa Cruz Biotechnology, SAD) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA).

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, membrana je isprana puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta) te inkubirana sa sekundarnim protutijelom tijekom 1 h na sobnoj temperaturi. Korištena su sljedeća sekundarna protutijela:

- za detekciju mišjih protutijela (pri analizi ekspresije Hsp70) korištena su IgG protutijela iz seruma konja imuniziranog imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody, #7076, Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:3000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju kunićjih protutijela (pri analizi aktivacije MAPK kinaza te ekspresije TLR2) korištena su IgG protutijela iz seruma kože imunizirane imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody, #7074, Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:3000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju mišjih protutijela (pri analizi ekspresije TLR4) korištena su protutijela iz seruma ovce imunizirane imunoglobulinima iz normalnog mišjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:10000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju kunićjih protutijela (pri analizi ekspresije MAPK i β -aktina) korištena su protutijela iz seruma ovce imunizirane imunoglobulinima iz normalnog kunićjeg seruma koja su konjugirana peroksidazom iz hrena (HRP) (goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004; Santa Cruz Biotechnology) (razrjeđenje 1:10000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu).

Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelom, membrana je isprana puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta) te se vizualizacija proteina postiže inkubacijom membrane tijekom 1 minute u mraku s reagensom za kemiluminiscenciju pripremljenim u laboratoriju (5 mg luminola (Sigma-Aldrich), 1 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 14 ml ultračiste H₂O, 5 μ l H₂O₂, 150 μ l pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich) u 10 ml DMSO-a). Membrana se zatim fotografira u uređaju za fotografiranje membrana Amersham AI600 Imager (GE Healthcare).

3.6. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR)

Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu određena je ekspresija receptora TLR. Ova metoda temelji se na lančanoj reakciji polimeraze (PCR) kojom je uz pomoć denaturacije DNA i korištenja specifičnih početnica omogućeno umnažanje točno određenog odsječka molekule DNA. U qPCR metodi je zbog korištenja fluorescentne unutarnje sonde moguća kontinuirana analiza produkata lančane reakcije.

RNA se iz stanica izolirala uz dodavanje 200 µl kloroforma na svakih 1 ml TriReagenta. Epruvetice su snažno protresene 15 sekundi te inkubirane na sobnoj temperaturi 10 minuta, a zatim centrifugirane 15 minuta na 12000 g pri +4 °C. Nakon toga vodena faza premještena je u čistu epruveticu od 1,5 ml gdje je dodano 0,5 ml izopropanola po 1 ml TriReagenta. Tako priređena smjesa inkubirana je na sobnoj temperaturi 10 minuta i centrifugirana 10 minuta na 12000 g pri +4 °C. Nadsloj je zatim uklonjen, a na talog RNA dodano je 1 ml 75 % etanola po 1 ml TriReagenta te se uzorak vorteksira. Otopina se centrifugira 5 minuta na 7500 g pri +4 °C. Etanol je uklonjen, a talog RNA osušen na zraku (oko 10 minuta). Otopina RNA priređena je u vodi bez RNaze te joj je određena koncentracija mjerenjem apsorbancije na 260 nm.

cDNA sintetizirana je iz RNA pomoću RevertAid First Strand cDNA Synthesis test paketa (Thermo Fisher Scientific, SAD).

RNA je razrijeđena vodom bez RNaza tako da u reakcijskoj smjesi bude 1000 ng RNA. Za svaku reakciju dodano je 1 µl početnica oligo dT, 1 µl početnica od nasumičnih heksanukleotida, 1 µl inhibitora RNaza, 4 µl reakcijskog pufera, 2 µl 10 mM smjese deoksinukleotid-trifosfata (dNTP) i 1 µl RevertAid M-MuLV reverzne transkriptaze. Tako priređena smjesa homogenizirana je na automatskoj miješalici (vorteks).

reakcija reverzne transkripcije provedena je u termomikseru (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, SAD), a program reakcijskog ciklusa obuhvaćao je inkubaciju tijekom 5 minuta pri 25 °C, zatim 60 minuta pri 42 °C, a reakcija je prekinuta zagrijavanjem na 70 °C tijekom 5 minuta. .

Nakon reverzne transkripcije cDNA se koristila kao uzorak u qPCR metodi uz primjenu sonde TaqMan u uređaju 7300 Real Time PCR System, uz korištenje TaqMan Universal MasterMix-a te TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, SAD):

- Hs02621280_s1 za TLR2

- Hs00152939_m1 za TLR4
- Hs99999907_m1 za β_2 -mikroglobulin (B2M)
- Hs99999904_m1 za peptidil-prolil-izomerazu A (PPIA)

Na ploču s 96 jažica za qPCR dodano je 5 μ l MasterMix-a, 0,5 μ l početnice s TaqMan sondom, 0,5 μ l cDNA i 4 μ l vode po jažici. Ploče su centrifugirane 30 sekundi na 500 g. reakcijski ciklus obuhvaćao je sljedeće korake: zagrijavanje na 50 °C tijekom 2 minute, zatim zagrijavanje na 95 °C tijekom 10 minuta te 40 ciklusa zagrijavanja na 95 °C 15 sekundi i na 60 °C 1 minutu u kojima se i vrši mjerenje fluorescencije.

TaqMan sonda je oligonukleotid koji je na svojem 5'-kraju obilježen fluorescentnom bojom, reporterom (FAM), a na 3'-kraju prigušivačem (eng. *quencher*). Količina PCR produkta mjerena je na principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET, eng. *fluorescence energy resonance transfer*) i 5'-egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze. TaqMan sonde i početnice vezale su se za cDNA, a prije produljenja početnice zbog blizine fluorescentne boje i prigušivača nije dolazilo do fluorescencije. Kako su se početnice produljivale, tako je istovremeno DNA polimeraza razgrađivala TaqMan sondu zbog svoje 5'-egzonukleazne aktivnosti, a posljedično je fluorescentna boja fluorescirala obzirom da se prigušivač više nije nalazio u blizini. Količina nastalog PCR produkta bila je razmjerna intenzitetu mjerene fluorescencije.

qPCR napravljen je

Ovom metodom određivana je ekspresija gena za *TKR2* i *TLR4*, a *B2M* i *PPIA* koji su imali ulogu referentnih gena, odnosno gena čija se ekspresija ne mijenja pod utjecajem različitih čimbenika te je ekspresija ostalih određivanih gena izražena prema njihovoj ekspresiji.

Relativna ekspresija gena čiju ekspresiju želimo odrediti (CILJ) izračunala se u odnosu na referentni gen (REF), te u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak (NT) prema sljedećim formulama, gdje Ct označava ciklus umnažanja u kojem je postignut prag detekcije signala za pojedini uzorak.

Relativna razina ekspresije = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{CILJ} - Ct_{REF})_{uzorak} - (Ct_{CILJ} - Ct_{REF})_{NT}$

3.7. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (SEM). Statistička analiza korištena za testiranje razlike između skupina podataka provedena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA, eng. One-way analysis of variance). *Post-hoc* analize provedene su Sidakovom metodom. Razina statističke značajnosti (α) u svim primijenjenim testovima iznosila je 0,05. Podaci su analizirani upotrebom programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., SAD).

4. REZULTATI

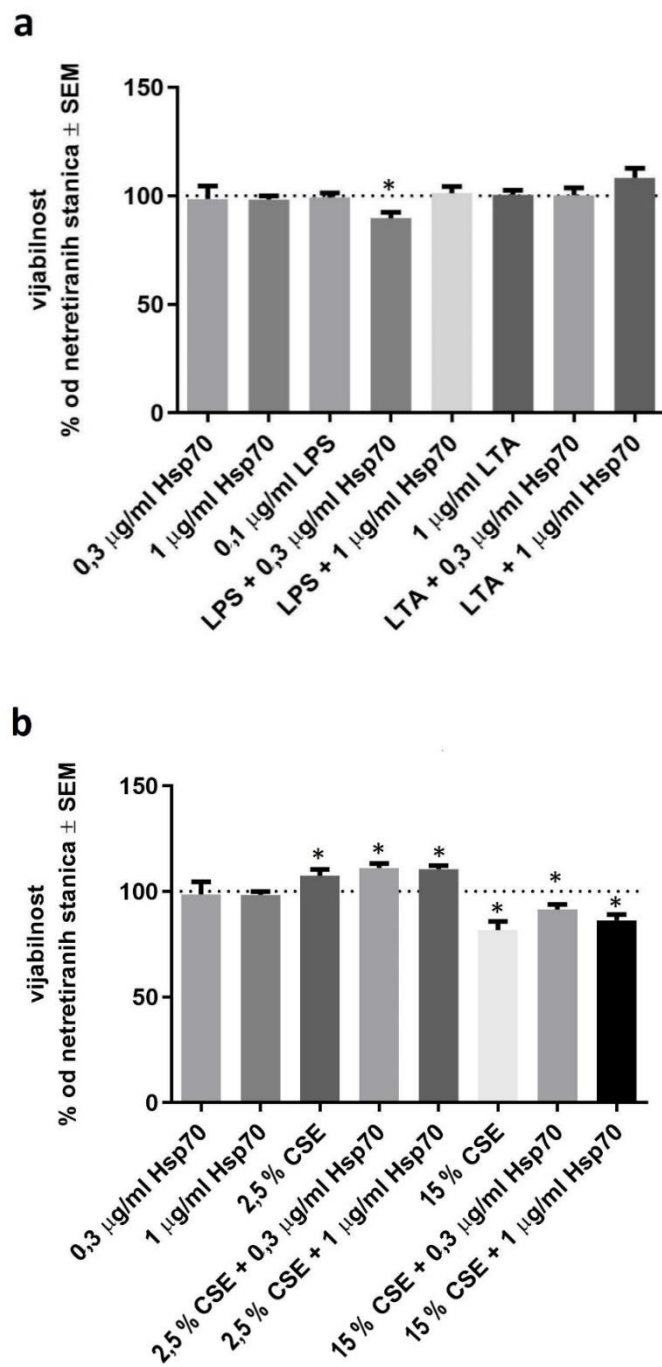
U ovome istraživanju ispitivana je uloga MAPK, unutarstaničnog Hsp70 i receptora TLR2 u upalnom odgovoru bronhijalnih epitelnih stanica izazvanom izlaganjem stanica rhHsp70, CSE-u, LPS-u i LTA-u. U istraživanju je korištena 16HBE stanična linija (epitelne bronhijalne stanice izolirane iz pluća jednogodišnjeg muškog pacijenta i imortalizirane SV40 plazmidom) te primarne bronhijalne epitelne stanice NHBE (normalne humane bronhijalne epitelne stanice). Citiotoksičnost pojedinih tretiranja određena je MTS testom. Ekspresija receptora TLR2 određena je qPCR-om, dok su aktivacija i ekspresija MAPK, ekspresija unutarstaničnog Hsp70 te ekspresija receptora TLR2 i TLR4 određena Western blot tehnikom.

4.1. Ispitivanje citotoksičnosti MTS testom vijabilnosti

16HBE stanice tretirane su 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70, 0,1 µg/ml LPS-om, 1µg/ml LTA-a, 2,5 % i 15 % CSE- te njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h. NHBE stanice su 24 h tretirane 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70, LPS-om, LTA-om, 2,5 % i 15 % CSE-om. Kao negativna kontrola korištene su netretirane stanice.

Vijabilnost 16HBE stanica smanjila je kombinacija LPS-a i 0,3 µg/ml Hsp70, dok pojedinačna tretiranja rhHsp70 i LPS-om nisu značajno utjecala na preživljavanje stanica. Tretiranja LTA-om ni u jednoj kombinaciji nisu dovela do statistički značajnih razlika u staničnome preživljavanju (Slika 4.a). Do smanjenja vijabilnosti dovelo je i tretiranje 15 % CSE-om kao i svim njegovim kombinacijama s rhHsp70. Ipak, usljed tretiranja stanica manjom koncentracijom CSE-a (2,5 %) i svim njegovim kombinacijama s rhHsp70 došlo je povećane vijabilnosti stanica (Slika 4.b).

Na vijabilnost NHBE stanica utjecao je samo 15 % CSE, koji je usprkos očekivanom smanjenju staničnog preživljavanja doveo do povećane vijabilnosti (Slika 5).

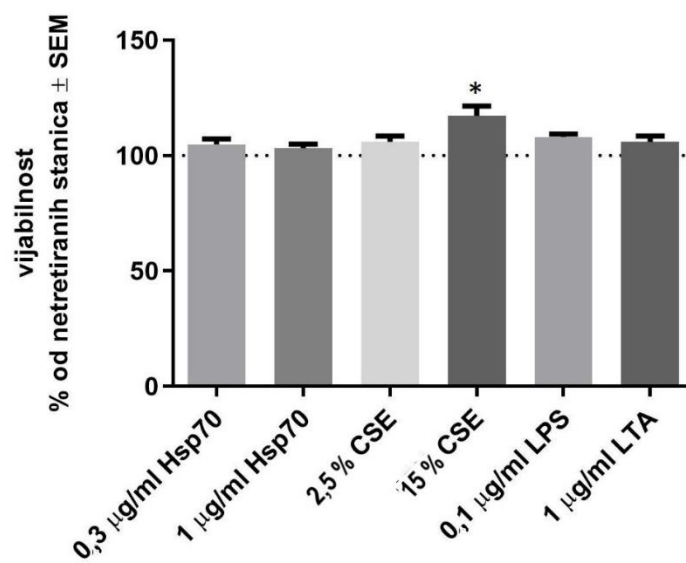


Slika 4. Grafički prikaz vijabilnosti 16HBE stanica tretiranih:

- a) LPS-om, LTA-om i njihovim kombinacijama s rhHsp70.
- b) CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (n=3).

* statistički značajno ($P < 0,05$) u odnosu na netretirane stanice



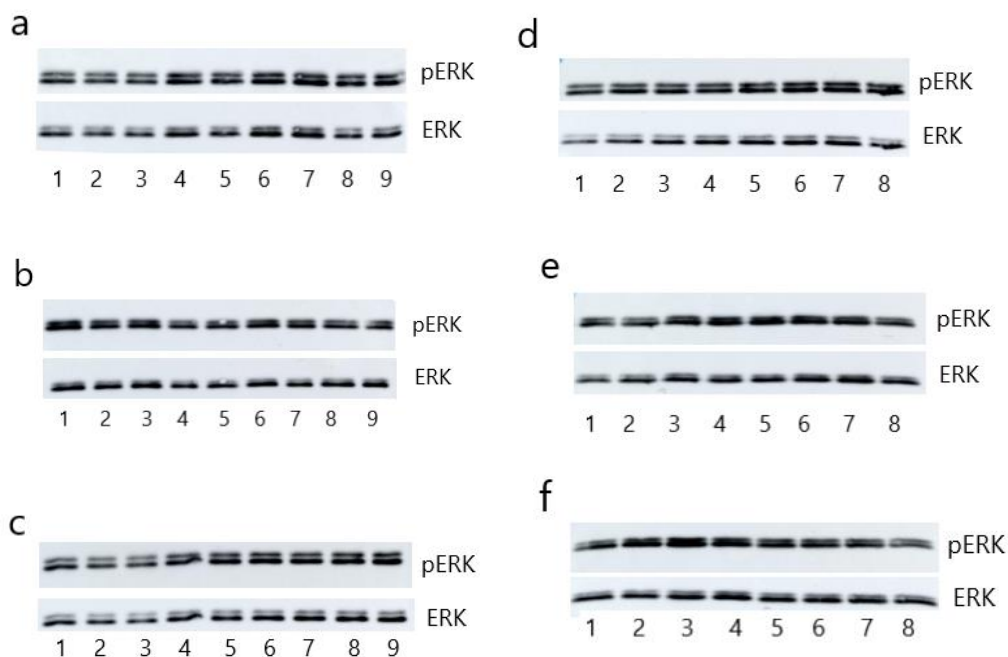
Slika 5. Grafički prikaz vijabilnosti NHBE stanica tretiranih rhHsp70, CSE-om, LPS-om i LTA-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna pogreška (n=3).

* statistički značajno ($P < 0,05$) u odnosu na netretirane stanice

4.2. Ispitivanje aktivacije MAPK i ekspresije unutarstaničnog Hsp70 Western blot tehnikom

16HBE stanice tretirane su 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS-om, 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA-om, 2,5 % i 15 % CSE-om te kombinacijama LPS-a, LTA-a, CSE-a s rhHsp70 tijekom 30 min, 2 h i 8 h. NHBE stanice tretirane su 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, LPS-om, LTA-om, 2,5 % i 15 % CSE-om u tijekom 30 min, 2 h i 8 h.

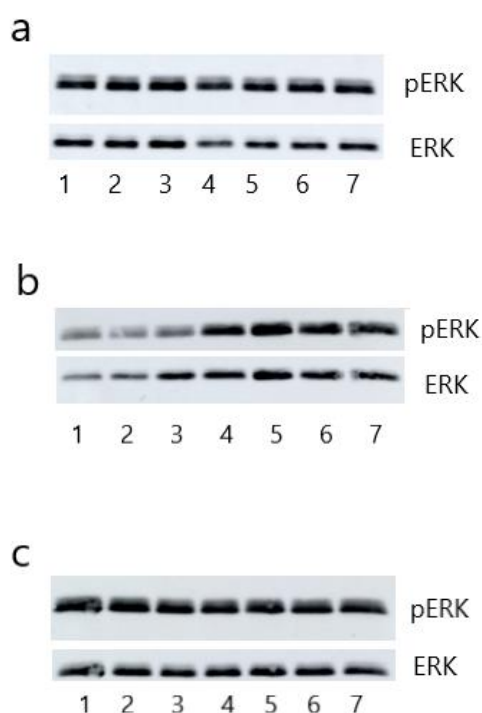
U 16HBE stanicama došlo je do povećane fosforilacije ERK-a u odnosu na netretirane stanice nakon 30 minuta izlaganja stanica LPS-u i LTA-u samim ili u kombinaciji s 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70 (Slika 6a), kao i 15 % CSE-u te kombinaciji 15 % CSE-a i 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70 (Slika 6d). Ipak, nakon 2 sata izlaganja došlo je do smanjene aktivacije ERK-a u stanicama tretiranim LPS-om kao i njegovom kombinacijom s 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70. Do smanjenja fosforilacije ERK-a isto je tako dovela i LTA u kombinacijama s obje koncentracije rhHsp70 (Slika 6b), dok niti jedno tretiranje CSE-om nije dovelo do promjene u aktivaciji ERK-a koja bi se mogla detektirati Western blot tehnikom (Slika 6e). Nakon 8 h izlaganja do povećane aktivacije ERK-a dovelo je zajedničko tretiranje s LTA i rhHsp70 (Slika 6c), kao i 2,5 % CSE te 3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70 (Slika 6d). Ostala tretiranja i nisu dovela do promjene u fosforilaciji koja bi se mogla detektirati Western blot tehnikom.



Slika 6. Western blot analiza aktivacije ERK u 16HBE stanicama tretiranim s 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA, 2,5 % i 15 % CSE i njihovim kombinacijama s rhHsp70 u tijekom: 30 min (**a, d**), 2 h (**b, e**) i 8 h (**c, f**)

- **a, b, c:** (1) netretirane stanice; (2) 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (4) LPS; (5) LPS + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (6) LPS + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (7) 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA; (8) LTA + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (9) LTA + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70
- **d, e, f:** (1) netretirane stanice; (2) 3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 2,5 % CSE; (4) 2,5 % CSE + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (5) 2,5 % CSE + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (6) 15 % CSE; (7) 15 % CSE + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (8) 15 % CSE + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70

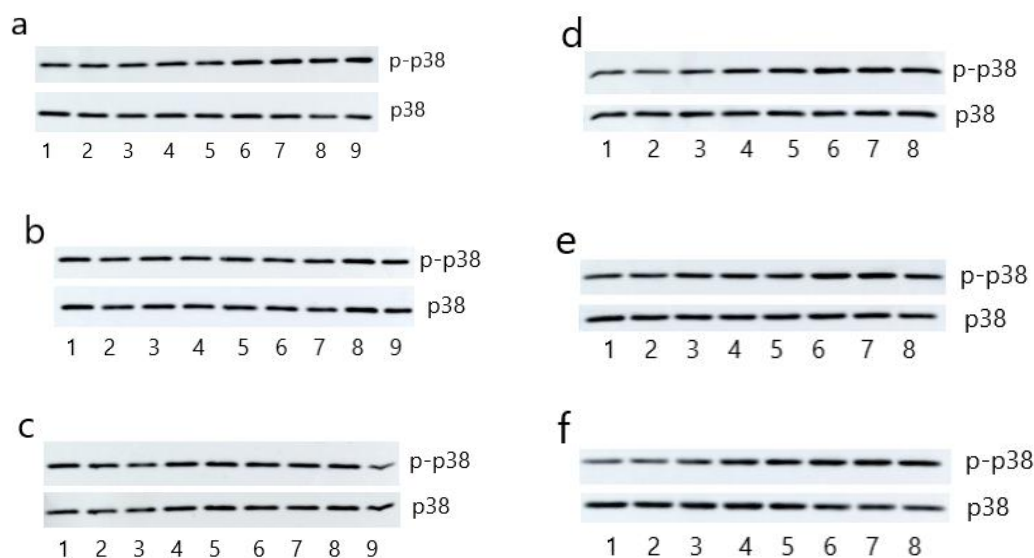
U NHBE stanicama niti jedno tretiranje nije dovelo do promjene u aktivaciji ERK-a u odnosu na netretirane stanice koja se mogla detektirati Western blot tehnikom (Slika 7).



Slika 7. Western blot analiza aktivacije ERK u NHBE stanicama tretiranim s 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA, 2,5 % i 15 % CSE tijekom: 30 min (**a**), 2 h (**b**) i 8 h (**c**)

a, b, c: (1) netretirane stanice; (2) 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 15 % CSE; (6) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; (7) 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA

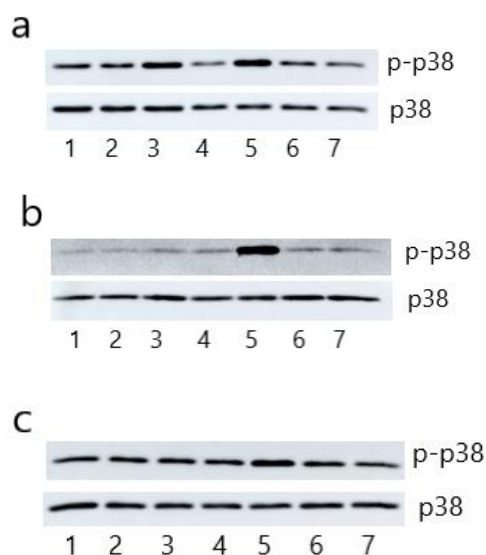
U 16HBE stanicama nakon 30 minuta tretiranja utvrđena je povećana aktivacija p38 u odnosu na netretirane stanice, u uzorcima izloženim kombinaciji LPS-a i 1 µg/ml rhHsp70 te samostalnom LTA-u kao i njegovoj kombinaciji sa svim koncentracijama rhHsp70 (Slika 8a). Nakon 2 sata izlaganja do blagog povećanja u fosforilaciji p38 dovelo je tretiranje kombinacijom LTA i 0,3 µg/ml rhHsp70, ali ostala tretiranja nisu dovela do značajnih promjena (Slika 8b). Isto tako 8 h izlaganja 16HBE stanica bilo kojem od tretiranja nije dovelo do povećanja aktivacije p38 koja se mogla detektirati Western blot tehnikom. Štoviše, tretiranje kombinacijom LTA i 1 µg/ml rhHsp70 dovelo je do blagog smanjenja fosforilacije p38 u odnosu na netretirane stanice (Slika 8c). Do značajne aktivacije p38 dovela su sva tretiranja stanica 2,5 % i 15 % CSE-om kao i njihovim kombinacijama s obje koncentracije Hsp70 tijekom svih vremena tretiranja. Sam rhHsp 70 nije utjecao na aktivaciju p38 (Slika 8d, 8e, 8f)



Slika 8. Western blot analiza aktivacije p38 u 16HBE stanicama tretiranim s 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA, 2,5 % i 15 % CSE i njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom: 30 min (**a, d**), 2 h (**b, e**) i 8 h (**c, f**)

- **a, b, c:** (1) netretirane stanice; (2) 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (4) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; (5) LPS + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (6) LPS + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (7) 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA; (8) LTA + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (9) LTA + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70
- **d, e, f:** (1) netretirane stanice; (2) 3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 2,5 % CSE; (4) 2,5 % CSE + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (5) 2,5 % CSE + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (6) 15 % CSE; (7) 15 % CSE + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (8) 15 % CSE + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70

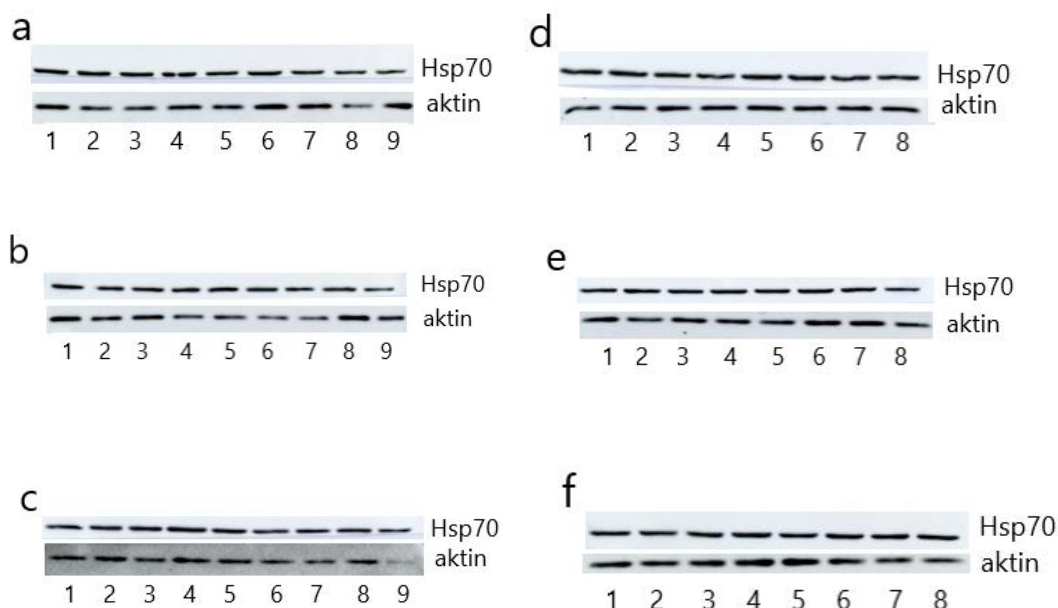
U NHBE stanicama do povećane fosforilacije došlo je nakon 30 minuta izlaganja 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70-u (Slika 9a). Do značajne aktivacije p38 došlo je nakon tretiranja stanica s 15 % CSE-om u svim vremenskim periodima (Slika 9a, 9b, 9c).



Slika 9. Western blot analiza aktivacije p38 u lizatima NHBE stanica tretiranih s 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA, 2,5 % i 15 % CSE tijekom: 30 min (**a**), 2 h (**b**) i 8 h (**c**)

a, b, c: (1) netretirane stanice; (2) 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 15 % CSE; (6) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; (7) 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA

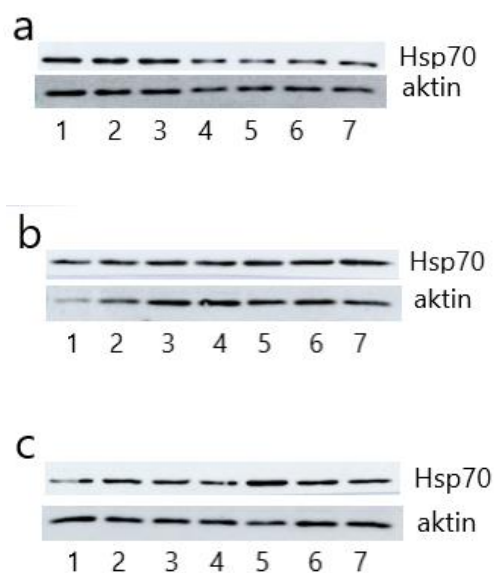
Nakon 30 minuta tetiranja 16HBE stanica došlo je do povećanja ekspresije Hsp70 u odnosu na netretirane stanice nakon izlaganja 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70 te samom LPS-u. S druge strane, LTA je u svim kombinacijama doveo do smanjenja koncentracije Hsp70, dok dim cigareta niti u jednoj koncentraciji nije uzrokovao promjenu koja se mogla detektirati Western blot tehnikom (Slika 10a, 10d). 2 sata tetiranja stanica LPS-om u svim kombinacijama, samim LTA-om, 3 µg/ml rhHsp70 kao i 2,5 % CSE-om u svim kombinacijama s rhHsp70, dovela su do povećane ekspresije unutarstaničnog Hsp70. Tretiranje s LTA-om u kombinaciji s obje koncentracije rhHsp70, slično kao nakon 30 min tretiranja, dovelo je do smanjenja ekspresije unutarstaničnog Hsp70 (Slika 10b, 10e). Nakon 8 h, 15 % CSE je sam i u svim kombinacijama s rhHsp70 doveo do povećane ekspresije Hsp70. Ostala tretiranja nisu dovela do promjena koje bi se mogle detektirati Western blot tehnikom.



Slika 10. Western blot analiza ekspresije unutarstaničnog Hsp70 u odnosu na aktin u 16HBE stanicama tretiranim s 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, LPS, 2,5 % i 15 % CSE te njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom: 30 min (**a, d**), 2 h (**b, e**) i 8 h (**c, f**)

- **a, b, c:** (1) netretirane stanice; (2) 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (4) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; (5) LPS + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (6) LPS + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (7) 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA; (8) LTA + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (9) LTA + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70
- **d, e, f:** (1) netretirane stanice; (2) 3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 2,5 % CSE; (4) 2,5 % CSE + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (5) 2,5 % CSE + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (6) 15 % CSE; (7) 15 % CSE + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (8) 15 % CSE + 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70

Na povećanu ekspresiju Hsp70 u NHBE stanicama utjecao je samo 15 % CSE nakon 8 sati tretiranja (Slika 11c). Niti jedan drugi način tretiranja nije uzrokovao promjenu koja se mogla detektirati Western blot analizom.



Slika 11. Western blot analiza ekspresije unutarstaničnog Hsp70 u odnosu na aktin u NHBE stanicama tretiranim s 0,3 i 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70, LPS, LTA, 2,5 % i 15 % CSE tijekom: 30 min (**a**), 2 h (**b**) i 8 h (**c**)

a, b, c: (1) netretirane stanice; (2) 0,3 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (3) 1 $\mu\text{g/ml}$ rhHsp70; (4) 2,5 % CSE; (5) 15 % CSE; (6) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; (7) 1 $\mu\text{g/ml}$ LTA

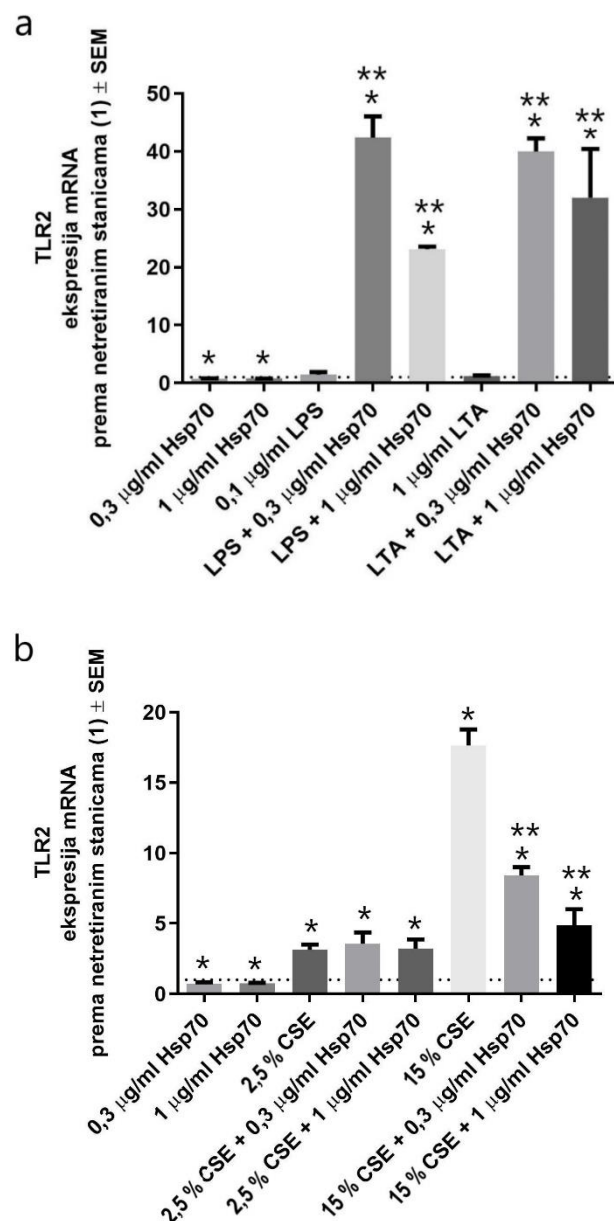
Receptori TLR2 i TLR4 nisu uspješno detektirani Western blot analizom (rezultati nisu prikazani).

4.3. Ekspresija receptora TLR2 određena qPCR-om

16HBE stanice tretirane su s 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70, 0,1 µg/ml LPS-om, 1 µg/ml LTA-om, 2,5 % i 15 % CSE-om te njihovim kombinacijama s rhHsp70 tijekom 24 h. Ekspresija mRNA receptora TLR2 odredila se pomoću qPCR-a. Ekspresija TLR2 receptora ovisi o koncentraciji izvanstaničnog Hsp70. Primjetili smo da tretiranja samim rhHsp70 dovode do smanjenja ekspresije receptora TLR2, dok tretiranja LPS-om i LTA-om ne dovode do statistički značajne promijene u odnosu na netretirane stanice. Ipak, kombinirana tretiranja pokazuju sinergističko djelovanje rhHsp70 i LPS ili LTA dovodeći do povećane ekspresije receptora TLR2. Štoviše, primjetili smo da manje koncentracije rhHsp70 u kombinaciji s LPS-om ili LTA-om djeluju više sinergistički, odnosno dovode do veće ekspresije receptora TLR2 u odnosu na netretirane stanice, ali i na tretiranja samim LPS-om ili LTA-om. Tretiranja samim CSE-om dovode to statistički značajnog povećanja ekspresije TLR2 receptora. Tretiranja 2,5 % CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70 dovela su do povećanja u ekspresiji receptora TLR2, ali nije primjećena razlika između tretiranja samim CSE-om i tretiranja njegovom kombinacijom s rhHsp70. Nakon izlaganja stanica 15 % CSE-u došlo je do značajnog povećanja ekspresije u odnosu na netretirane stanice. Kombinirana tretiranja 15 % CSE-a i rhHsp70, u obje koncentracije, pokazala su povećanu ekspresiju receptora TLR2 u odnosu na netretirane stanice, ali smanjenu ekspresiju TLR2 u odnosu na 15 % CSE. To ukazuje na antagonistički učinak viših koncentracija CSE-a i rhHsp70 (Slika 12a, 12b).

NHBE stanice su 24 h tretirane 0,3 i 1 µg/ml rhHsp70, 0,1 µg/ml LPS-om, 1 µg/ml LTA-om, 2,5 % i 15 % CSE-om, ali niti jedan od ovih načina tretiranja nije značajno utjecao na ekspresiju TLR2 receptora u odnosu na netretirane stanice (rezultati nisu prikazani).

qPCR tehnikom nije uspješno detektirana ekspresija receptora TLR4 u 16HBE i NHBE stanicama.



Slika 12. Grafički prikaz ekspresije receptora TLR2 određene qPCR-om u 16HBE stanicama tretiranim:

a) LPS-om, LTA-om i njihovim kombinacijama s rhHsp70.

* statistički značajno ($P < 0,05$) u odnosu na netretirane stanice

** statistički značajno ($P < 0,05$) u odnosu na LPS ili LTA

b) CSE-om i njegovim kombinacijama s rhHsp70.

* statistički značajno ($P < 0,05$) u odnosu na netretirane stanice

** statistički značajno ($P < 0,05$) u odnosu na 2,5 % ili 15 % CSE

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška ($n=3$).

5. RASPRAVA

Glavni čimbenik rizika za nastanak KOPB-a je dim cigareta. Udisanje dima cigareta za posljedicu ima razvoj upale koja dovodi do uništavanja parenhimskog tkiva. LPS i LTA dijelovi su Gram-negativnih odnosno Gram-pozitivnih bakterija. Vezanjem na receptore TLR dovode do aktivacije imunskog sustava te upalnog odgovora. Zbog toga se smatraju jednim od glavnih uzročnika egzacerbacije KOPB-a. Izvanstanični Hsp70 isto tako spada u skupinu DAMP molekula te se veže na receptore TLR2 i TLR4 na taj način potičući sintezu upalnih citokina preko NF- κ B i MAPK signalnih putova (Ferat-Osorio i sur., 2014; Thériault i sur., 2005). U ovome istraživanju promatrali smo učinak CSE-a, LPS-a, LTA-a te eHsp70 na 16HBE i NHBE stanice koje se koriste kao modeli za plućnu komponentu KOPB-a. Ispitali smo na koje načine MAPK signalni putovi, unutarstanični Hsp proteini te receptori TLR2 i TLR4 sudjeluju u procesu stanične smrti i nastanku upalnog odgovora u navedenim stanicama.

U ovom ispitivanju utvrđeno je da LPS i LTA sami kao i u kombinaciji s rhHsp70 ne utječu značajno na vijabilnost 16HBE i NHBE stanica. To je u skladu s radom Sangiorgia i suradnika koji je pokazao da LTA ne smanjuje vijabilnost 16HBE stanica (Sangiorgi i sur., 2017). Liu je MTS testom na A549 stanicama pokazao da LTA ne utječe na metaboličku aktivnost stanica (Liu i sur., 2012). Ipak, LTA u visokim koncentracijama može dovesti do smanjenja redukcijske sposobnosti dermalnih fibroblasta (Choi i sur., 2010). Isto tako, ispitivanje vijabilnosti na THP-1 stanicama pokazala su da LPS u nižim koncentracijama ne utječe na redukcijsku sposobnost stanica, ali da u koncentracijama ≥ 10 μ g/ml dovodi do smanjenja metaboličke aktivnosti (Huang i sur., 2012). Verspohl i Podlogar su pokazali da LPS ne uzrokuje promjenu vijabilnosti u BEAS-2B stanicama (J. Verspohl i Podlogar, 2012). Ipak, rezultati MTS testa na A549 alveolarnim epitelnim stanicama pokazali su da LPS dovodi do povećane proliferacije stanica (Hattar i sur., 2013). U ovome istraživanju CSE je imao veći učinak na promjenu vijabilnosti 16HBE stanica. Pokazano je da manje koncentracije CSE-a (2,5 %) povećavaju proliferaciju stanica te da tretiranje stanica kombinacijom rhHsp70 i CSE-a ne daje rezultate koji se značajno razlikuju od tretiranja samim CSE-om. S druge strane 15 % CSE dovodi do značajnog smanjenja metaboličke aktivnosti 16HBE stanica. Ipak, u NHBE stanicama je, suprotno očekivanom, uočena povećana proliferacija usljed tretiranja 15 % CSE-om.

Kaushik je u svom istraživanju isto tako pokazao da CSE u niskim koncentracijama izaziva proliferaciju, a u višim koncentracijama i tijekom dužeg vremena izlaganja izaziva apoptozu A549 stanica (Kaushik i sur., 2008). Ipak, rezultati se razlikuju ovisno o vrsti stanica te načinu pripreme ekstrakta dima cigareta. Tako su Seehasee i suradnici na A549 stanicama pokazali citotoksičnost i nižih koncentracija CSE-a (Seehase i sur., 2014). Na stanicama nazalnog epitela, CSE je uzrokovao značajnu citotoksičnost ovisnu o koncentraciji i vremenu izloženosti (Lan i sur., 2007), dok je do značajne citotoksičnosti i oštećenja DNA došlo usljed tretiranja CSE-om u stanicama humanog bronhijalnog epitela (Liu i sur., 2008; Kim i sur., 2004).

Nadalje, pokazano je da izlaganje 16HBE stanica LPS-u, LTA-u, rhHsp70 i CSE-u dovodi do aktivacije ERK signalnih putova koja ovisi o vremenu i koncentraciji tretiranja. Tako je primijećeno da gotovo sva tretiranja dovode do aktivacije ERK-a nakon kraćeg vremena izlaganja (30 min). Ipak, nakon 8 sati izlaganja do aktivacije je dovela niža koncentracija CSE-a (2,5 %) kao i LTA te rhHsp70. Stoga se može predložiti da niže koncentracije CSE-a dovode do poremećene proliferacije stanice usljed dugoročne izloženosti. U NHBE stanicama niti jedan način tretiranja nije doveo do značajne aktivacije ERK-a. Na aktivaciju p38 u 16HBE stanicama najviše je utjecao CSE koji dovodi do povećane fosforilacije u svim koncentracijama i vremenima. S druge strane, LTA i LPS su do povećane aktivacije doveli samo nakon kraćeg vremena izlaganja (30 min). Ti rezultati bi mogli ukazivati na ulogu p38 u akutnoj bakterijskoj upali, ali i na njegovo poremećeno djelovanje usljed izlaganja CSE-u. To je u skladu s radom u kojem je Western blot tehnikom pokazana povećana aktivacija p38 usljed ozljeda uzrokovanim Gram-pozitivnim ili Gram-negativnim bakterijama u *Drosophili* (Chen i sur., 2010). Do aktivacije p38 u NHBE stanicama došlo je samo nakon izlaganja 15 % CSE-u. To bi moglo značiti da su NHBE stanice manje osjetljive na CSE od 16HBE stanica. U prijašnjim radovima Morissett i suradnici su predložili da bi smrt strukturnih stanica pluća kao odgovor na dim cigareta mogla biti uzrokovana oksidacijskim stresom ili posljedicama aktivacije MAPK kao odgovor na unutarstanični stres (Morissette i sur., 2009). Ovisno o podržaju, aktivacija MAPK signalnih putova može dovesti do stanične proliferacije, diferencijacije ili smrti, što u konačnici može dovesti do upalnog odgovora (Roux i Blenis, 2004). Hellermann i suradnici su pokazali da aktivacija ERK1/2 u NHBE ovisi o dozi kondenzata dima cigareta (Hellermann i sur., 2002). Luppi i suradnici su pokazali da niže koncentracije kondenzata dima cigareta dovode do aktivacije ERK1/2 u bronhijalnim epitelnim stanicama NCI-H292, dok više koncentracije u istim stanicama aktiviraju p38 i JNK (Luppi i sur., 2005). Povećana aktivacija upalnog p38 primjećena je i u plućnim fibroblastima izloženim CSE-u (Kim i sur., 2011). Ipak,

u nekim studijama je pokazano da CSE ne aktivira MAPK (C.-J. Li i sur., 2007). To ukazuje da aktivacija različitih MAPK ponajprije ovisi o vrsti stanica korištenim u ispitivanjima, načinu pripreme ekstrakta dima cigareta te o duljini tretiranja. U alveolarnim makrofagima pušača pronađene su manje koncentracije aktiviranog p38 u usporedbi s nepušačima. Ipak, tretiranje stanica lipopolisaharidima dovelo je do brže aktivacije p38 u pušača u usporedbi s nepušačima, ali nije pronađena razlika u aktivaciji ERK i JNK (Mochida-Nishimura i sur., 2001). U prijašnjem istraživanju, Rumora i suradnici su u leukocitima bolesnika oboljelih od KOPB-a i zdravih osoba ustvrdili aktivaciju ERK-a kod svih nepušača, a osobito kod zdravih pojedinaca. Aktivacija JNK i p38 bila je pronađena u pušača i bivših pušača oboljelih od KOPB, ali i u zdravim pušačima (Rumora i sur., 2008).

U ovome je radu pokazano da u 16HBE stanicama do smanjenje ekspresije Hsp70 dolazi nakon tretiranja LPS-om i LTA-om. To je u skladu s njegovom protu-upalnom ulogom unutar stanice. CSE je na ekspresiju Hsp70 utjecao samo nakon 8 h izlaganja u 15 %-tnoj koncentraciji. Može se predložiti da Hsp70 pokušava smanjiti upalni odgovor izazvan CSE-om nakon dužeg perioda izlaganja. To je u skladu s prijašnjim ispitivanjima koja su pokazala da dolazi do povećanja ekspresije Hsp70 u plućnim fibroblastima pod utjecajem CSE-a (W. Li i sur., 2007) te povećanja Hsp70 u A549 stanicama (Somborac-Baćura i sur., 2018). Većina *in vitro* istraživanja pokazuje povećanu ekspresiju različitih Hsp-ova nakon tretiranja CSE-om, dok istraživanja provedena na uzorcima bolesnika s KOPB-om pokazuju da je kod njih ekspresija Hsp proteina smanjena (Hacker i sur., 2009). Razlog tome mogao bi biti da do razvoja KOPB-a dolazi zbog iscrpljivanja obrambenih mehanizama tijekom duljeg vremenskog perioda zbog kroničnog izlaganja negativnim učincima dima cigareta kod pojedinaca, dok *in vitro* studije pokazuju prolaznu indukciju Hsp-a u stanicama tretiranim CSE-om.

U ovome radu utvrđeno je kako sam rhHsp70 u 16HBE stanicama smanjuje ekspresiju mRNA za receptore TLR2, dok sami LPS i LTA ne utječu značajno na njezinu ekspresiju. Ipak, nakon kombiniranih tretiranja došlo je do značajnog povećanja u ekspresiji TLR2 mRNA. Stoga možemo predložiti da postoji svojevrstni sinergizam između LPS-a ili LTA-a te rhHsp70 u povećanju ekspresije receptora TLR2. Isto tako primijećeno je da ekspresija receptora TLR2 ovisi o koncentraciji CSE-a te da rhHsp70 smanjuje ekspresiju mRNA koju uzrokuju više koncentracije CSE-a (15 %). Za NHBE stanice nije primijećen značajan utjecaj na promjenu ekspresije. Prijašnja istraživanja pokazala su kako eHsp70 može inducirati ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora (Dybdahl i sur., 2005; Asea i sur., 2000). Isto tako, Vabulas je pokazao da

eHsp70 povećava ekspresiju receptora TLR2 i TLR4 (Vabulas i sur., 2002) u 293T fibroblastima. S druge strane, u istraživanju provedenom na NHBE i PBEC stanicama zdravih donora pokazano je da eHsp70 ne utječe na ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora, dok je u PBEC stanicama prikupljenih od osoba koje boluju od KOPB-a primjećeno značajno smanjenje mRNA za oba receptora nakon tretiranja samim eHsp70 (Hulina-Tomašković i sur., 2019). Ipak, istraživanja o učinku eHsp70 na ekspresiju TLR2 receptora veoma su ograničena. Stoga, se može predložiti da učinak eHsp70 na ekspresiju receptora TLR ovisi o vrsti stanica. S druge strane, postoje različita istraživanja o utjecaju CSE-a na TLR receptore. Tako su Mortaz i suradnici pokazali da CSE dovodi do povišene ekspresije ukupnog receptora TLR4 u 16HBE stanicama (Mortaz i sur., 2011). U stanicama koštane srži, CSE je povisio ekspresiju TLR2 i TLR4 receptora (Zhou i sur., 2011), dok je u A549 stanicama usljed izlaganja CSE-u došlo do sniženja ekspresije mRNA za TLR4 receptore, ali je ekspresija receptora TLR2 ostala nepromijenjena (MacRedmond i sur., 2007). TLR receptori značajno su uključeni u egzacerbacije KOPB-a budući da su primarni medijatori preko kojih se aktivira imunosti odgovor na bakterije u dišnim putovima (Zuo i sur., 2015). Zbog toga, smanjeno djelovanje TLR receptora može dovesti do smanjene osjetljivosti na bakterije, dok povećana aktivnost receptora TLR za posljedicu može imati neprikladno jaki upalni odgovor koji može dovesti do oštećenja tkiva (Bezemer i sur., 2012). Tako su Droemann i suradnici u alveolarnim makrofagima bolesnika s KOPB-om opazili sniženu ekspresiju TLR2 receptora (Droemann i sur., 2005), dok Metcalfe i suradnici nisu pronašli razliku u ekspresiji gena za TLR2 i TLR4 receptore u alveolarnim makrofagima izoliranim od bolesnika s KOPB-om nakon tretiranja CSE-om (Metcalfe i sur., 2014). Zuo i suradnici primjetili su povećanu ekspresiju receptora TLR1 i TLR2 na T limfocitima bolesnika s KOPB-om (Zuo i sur., 2015). U konačnici, utjecaj CSE-a na ekspresiju TLR receptora povezan je s koncentracijom CSE-a kao i njegovim načinom pripreme, ali ovisi i o vrsti stanica na kojima su istraživanja provedena.

6. ZAKLJUČCI

1. 15 % CSE smanjuje vijabilnost 16HBE stanica.
2. 2,5 % CSE povećava vijabilnost 16HBE stanica, što bi moglo upućivati na poremećenu proliferaciju stanica uslijed izlaganja manjim koncentracijama CSE-a.
3. 15 % CSE povećao je vijabilnost NHBE stanica, što bi moglo ukazivati na poremećenu proliferaciju, ali i na manju osjetljivost NHBE stanica u usporedbi s 16HBE stanicama.
4. LPS i LTA aktiviraju MAPK nakon kraćeg vremena izlaganja.
5. CSE potiče kratkotrajnu i dugotrajnu aktivaciju MAPK.
6. rhHsp70, LPS, LTA, CSE te njihove kombinacije aktiviraju MAPK ovisno o vrsti stanica, primijenjenoj koncentraciji i vremenu tretiranja.
7. rhHsp70 smanjuje ekspresiju mRNA za receptor TLR2 u 16HBE stanicama.
8. LPS i LTA ne utječu značajno ekspresiju mRNA za receptor TLR2 u 16HBE stanicama.
9. rhHsp70 pokazuje sinergistički učinak s LPS-om i LTA-om na povećanje ekspresije mRNA za receptor TLR2 u 16HBE stanicama.
10. rhHsp70 u kombinaciji s 15 % CSE-om smanjuje ekspresiju mRNA za receptor TLR2 u odnosu na sam 15 % CSE, što ukazuje na njihovo antagonističko djelovanje u 16HBE stanicama.
11. Povećanje ekspresije mRNA za receptor TLR2 ovisi o koncentraciji CSE-a.

7. LITERATURA

- Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papana A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis *J Glob Health*, 2015, 5
- Asea A, Kabingu E, Stevenson MA, Calderwood SK. HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones*, 2000, 5, 425–431.
- Baglolo CJ, Sime PJ, Phipps RP. Cigarette smoke-induced expression of heme oxygenase-1 in human lung fibroblasts is regulated by intracellular glutathione. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295, L624–L636.
- Barnes PJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Clin Chest Med*, 2014, 35, 71–86.
- Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms *Eur Respir J*, 2003, 22, 672–688.
- Bezemer GFG, 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.
- Borges TJ, Wieten L, Van Herwijnen MJC, Broere F, Van derZee R, Bonorino C, Van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70 *Front Immunol*, 2012, 3, 1–12.
- Chaudhuri N, Dower SK, Whyte MKB, Sabroe I. Toll-like receptors and chronic lung disease *Clin Sci*, 2005, 109, 125–133.
- Chaudhuri N, Whyte MKB, Sabroe I. Reducing the toll of inflammatory lung disease *Chest*, 2007, 131, 1550–1556.
- Chen J, Xie C, Tian L, Hong L, Wu X, Han J. Participation of the p38 pathway in Drosophila host defense against pathogenic bacteria and fungi 2010
- Choi JY, Lee JA, Lee JB, Yun SJ, Lee SC. Anti - Inflammatory Activity of Houlttuynia cordata against Lipoteichoic Acid - Induced Inflammation in Human Dermal

- Fibroblasts 2010, 46, 140–147.
- Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B *Nature*, 1995, 377, 446–448.
- Decramer M, Janssens W, Miravittles M. , 2012. Chronic obstructive pulmonary diseaseU: The Lancet. 2012, str. 1341–1351. . doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases *Oncogene*, 2003, 22, 8543.
- Demedts IK, Brusselle GG, Bracke KR, Vermaelen KY, Pauwels RA. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5, 257–263.
- 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.
- Diaz-Guzman E, Mannino DM. Epidemiology and prevalence of chronic obstructive pulmonary disease *Clin Chest Med*, 2014, 35, 7–16.
- Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res*, 2005, 6, 68.
- Dybdahl B, Slørdahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart*, 2005, 91, 299–304.
- Eastman A. Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis *Semin Cancer Biol*, 1995, 6, 45–52.
- Ferat-Orsorio E, Sánchez-Anaya A, Gutiérrez-Mendoza M, Boscó-Gárate I, Wong-Baeza I, Pastelin-Palacios R, Pedraza-Alva G, Bonifaz LC, Cortés-Reynosa P, Pérez-Salazar E, Arriaga-Pizano L, López-Macías C, Rosenstein Y, Isibasi A. Heat shock protein 70 down-regulates the production of toll-like receptor-induced pro-inflammatory cytokines by a heat shock factor-1/constitutive heat shock element-binding factor-dependent mechanism. *J Inflamm (Lond)*, 2014, 11, 19.
- Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). , 2019. GOLD 2019 Global

Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. 2019.

- Hacker S, Lambers C, Hoetzenecker K, Pollreisz A, Aigner C, Lichtenauer M, Mangold A, Niederpold T, Zimmermann M, Taghavi S, Klepetko W, Ankersmit HJ, Hacker S, Lambers C. Elevated HSP27, HSP70 and HSP90 α in chronic obstructive pulmonary disease: Markers for immune activation and tissue destruction *Clin Lab*, 2009, 55, 31–40.
- Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, MacNee W, Make BJ, Rabe KF, Rennard SI, Sciurba FC, Silverman EK, Vestbo J, Washko GR, Wouters EFM, Martinez FJ. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: The future of COPD *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182, 598–604.
- Hattar K, Savai R, Subtil FSB, 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.
- Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, Lockey RF, Mohapatra SS. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells *Respir Res*, 2002, 3, 22.
- Huang M-Y, Liao M-H, Wang Y-K, Huang Y-S, Wen H-C. Effect of Lavender Essential Oil on LPS-Stimulated Inflammation *Am J Chin Med*, 2012, 40, 845–859.
- Hulina-Tomašković A, Heijink IH, Jonker MR, Somborac-Baćura A, Grdić Rajković M, Rumora L. Pro-inflammatory effects of extracellular Hsp70 and cigarette smoke in primary airway epithelial cells from COPD patients *Biochimie*, 2019, 156, 47–58.
- J. Verspohl E, Podlogar J. LPS-Induced Proliferation and Chemokine Secretion from BEAS-2B Cells *Pharmacol & Pharm*, 2012, 03, 166–177.
- Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 310–318.

- Kant S, Mahdi AA, Rizvi SHM, Tripathi PM, Yadav RS, Kushwaha RAS, Prakash V, Parveen A, Ahmad I. Expression of Toll-like Receptor 2 and 4 in Peripheral Blood Neutrophil Cells from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Oman Med J*, 2017, 32, 477–485.
- Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells *Cancer Lett*, 2008, 270, 120–131.
- Kawai T, Akira S. review The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : update on Toll-like receptors *Nat Publ Gr*, 2010, 11, 373–384.
- Kim H, Liu X, Kobayashi T, Conner H, Kohyama T, Wen FQ, Fang Q, Abe S, Bitterman P, Rennard SI. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31, 483–490.
- Kim SY, Lee JH, Huh JW, Ro JY, Oh YM, Lee S Do, An S, Lee YS. Cigarette smoke induces Akt protein degradation by the ubiquitin-proteasome system *J Biol Chem*, 2011, 286, 31932–31943.
- Kode A, Yang S-R, Rahman I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells *Respir Res*, 2006, 7, 132.
- Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agustí A, Sonia Buist A, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: An analysis of the Framingham Offspring Cohort *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180, 3–10.
- Lan M-Y, Ho C, Lee T-C, Yang A-H. Cigarette smoke extract induces cytotoxicity on human nasal epithelial cells. *Am J Rhinol*, 2007, 21, 218–223.
- Li C-J, Ning W, Matthay M a, Feghali-Bostwick C a, Choi AMK. MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292, L1297-303.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an

apoptotic protease cascade *Cell*, 1997, 91, 479–489.

Li W, Xu YJ, Shen HH. Effect of cigarette smoke extract on lipopolysaccharide-activated mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured cells *Chin Med J*, 2007, 120, 1075–1081.

Liu F-L, Chuang C-Y, Tai Y-T, Tang H-L, Chen T-G, Chen T-L, Chen R-M. Lipoteichoic acid induces surfactant protein-A biosynthesis in human alveolar type II epithelial cells through activating the MEK1/2-ERK1/2-NF- κ B pathway. *Respir Res*, 2012, 13, 88.

Liu X, Togo S, Al-Mugotir M, Kim H, Fang Q, Kobayashi T, Wang X, Mao L, Bitterman P, Rennard S. NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract *Respir Res*, 2008, 9, 66.

Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2, 545.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, AlMazroa MA, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak A Bin, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Memish ZA, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasser K, Norman P,

- O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope III CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJL. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 *Lancet*, 2012, 380, 2095–2128.
- Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway *Cytokine*, 2008, 42, 145–151.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1-s2.0-S0092867400815895-main1998, 94, 481–490.
- 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 *Respir Res*, 2005, 6, 140.
- MacRedmond RE, Greene CM, Dorscheid DR, McElvaney NG, O'Neill SJ. Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke *Respir Res*, 2007, 8, 84.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 *PLoS Med*, 2006, 3, 2011–2030.
- Metcalf H, Lea S, Hughes D, Khalaf R, Abbott-Banner K, Singh D. Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages *Clin Exp Immunol*, 2014, 176, 461–472.
- Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and

- disease *J Endocrinol*, 2007, 193, 323–330.
- Mochida-Nishimura K, Surewicz K, Cross J V, Hejal R, Templeton D, Rich EA, Toossi Z. Differential activation of MAP kinase signaling pathways and nuclear factor-kappaB in bronchoalveolar cells of smokers and nonsmokers *Mol Med*, 2001, 7, 177–185.
- Molfini NA. Current thinking on genetics of chronic obstructive pulmonary disease *Curr Opin Pulm Med*, 2007, 13, 107–113.
- Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation 2016, 2016
- 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.
- Mortaz E, Henricks PAJ, Kraneveld AD, Givi ME, Garssen J, Folkerts G. Cigarette smoke induces the release of CXCL-8 from human bronchial epithelial cells via TLRs and induction of the inflammasome *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 2011, 1812, 1104–1110.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex *Cell*, 1996, 85, 817–827.
- Opitz B, Van Laak V, Eitel J, Suttrop N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181, 1294–1309.
- Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response *Lancet*, 2003, 362, 469–476.
- Postma DS, Rabe KF. The Asthma–COPD Overlap Syndrome *N Engl J Med*, 2015, 373, 1241–1249.
- Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions : a literature review 2015, 885–892.

- Rao R V, Hermel E, Castro-obregon S, Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program: role of the ER chaperone GRP78 *FEBS Lett*, 2001, 276, 33869–33874.
- 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, 68, 320–344.
- Rumora L, Milevoj L, Popović-Grle S, Barišić K, Čepelak I, Grubišić TŽ. Levels changes of blood leukocytes and intracellular signalling pathways in COPD patients with respect to smoking attitude *Clin Biochem*, 2008, 41, 387–394.
- Rumora L, Žanić Grubišić T. kinase signalling cascades in cell proliferation and apoptosisU: Biochemistry and immunology intersections. Markotić A, urednik, Trivandrum, Research Signpost, 2008, str. 151–171.
- Sandor F, Buc M. Toll-like Receptors . II . Distribution and Pathways Involved in TLR Signalling2014
- Sangiorgi C, Vallese D, Gnemmi I, Bucchieri F, Balbi B, Brun P, Leone A, Giordano A, Macario EC De, Macario AJL, Cappello F, Stefano A Di. HSP60 activity on human bronchial epithelial cells2017
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin K, Krammer PH, Peter ME. EMBO J 1998 Scaffidi1998, 17, 1–13.
- Seehase S, Baron-Luehr B, Kugler C, Vollmer E, Goldmann T. , 2014. Alveolar epithelial cells type II show a high sensitivity to cigarette smoke extractU: Pneumologie 2014. 2014, str. 68-A11. .
- Sevin M, Girodon F, Garrido C, de Thonel A. HSP90 and HSP70: Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms *Mediators Inflamm*, 2015, 2015, 1–8.
- Sharp FR, Zhan X, Liu DZ. Heat Shock Proteins in the Brain: Role of Hsp70, Hsp 27, and HO-1 (Hsp32) and Their Therapeutic Potential *Transl Stroke Res*, 2013, 4, 685–692.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang H, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. 99224541999, 144, 281–292.

- Somborac-Baćura A, Rumora L, Novak R, Rašić D, Dumić J, Čepelak I, Žanić-Grubišić T. Differential expression of heat shock proteins and activation of mitogen-activated protein kinases in A549 alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke extract *Exp Physiol*, 2018, 103, 1666–1678.
- SZEGEZDI EVA, FITZGERALD UNA, SAMALI A. Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010, 186–194.
- Takeda K. TLR signaling pathways *Semin Immunol*, 2004, 16, 3–9.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways *Semin Immunol*, 2004, 16, 3–9.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21, 335–376.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation *Cell*, 2010, 140, 805–820.
- Tang D, Kidd VJ. Cleavage of DFF-45 / ICAD by Multiple Caspases Is Essential Apoptosis * *Biochemistry*, 1998, 28549–28552.
- Thériault JR, Mambula SS, Sawamura T, Stevenson MA, Calderwood SK. Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells *FEBS Lett*, 2005, 579, 1951–1960.
- Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway *J Biol Chem*, 2002, 277, 15107–15112.
- van der Toorn M, Slebos D-J, de Bruin HG, Leuvenink HG, Bakker SJL, Gans ROB, Koëter GH, van Oosterhout AJM, Kauffman HF. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292, L1211-8.
- Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol*, 2001, 21, 5899–5912.
- Vestbo J. COPD: Definition and phenotypes *Clin Chest Med*, 2014, 35, 1–6.

- Wood A, Stockley R. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 2006, 7, 130.
- Yamamoto K, Sasada M, Okazaki T, Kobayashi S, Takahashi A, Sawai H, Yonehara S, Hirata H. Caspases Are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-induced Apoptosis *J Exp Med*, 2002, 187, 587–600.
- Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection *Nat Rev Immunol*, 2014, 14, 109–121.
- Zhou J, Eksioglu EA, Fortenbery NR, Chen X, Wang H, Epling-Burnette PK, Djeu JY, Wei S. Bone marrow mononuclear cells Up-Regulate Toll-Like receptor expression and produce inflammatory mediators in response to cigarette smoke extract *PLoS One*, 2011, 6
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in 1997, 90, 405–413.
- Zuo L, Lucas K, Fortuna CA, Chuang C-C, Best TM. Molecular Regulation of Toll-like Receptors in Asthma and COPD *Front Physiol*, 2015, 6

8. SAŽETAK / SUMMARY

Dim cigareta smatra se jednim od glavnih čimbenika u razvoju kronične opstruktivske plućne bolesti (KOPB). Upalnom odgovoru pridonosi izvanstanični protein toplinskog šoka 70 (Hsp70) aktivacijom receptora 2 i 4 sličnih Tollu (TLR2 i TLR4), što dovodi do kaskadne aktivacije protein-kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK), poput protein-kinaza reguliranih izvanstaničnim signalima (ERK) i p38. Suprotno tome, unutarstanični Hsp70 potiskuje upalni odgovor. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta (CSE), lipopolisaharida (LPS) i lipoteikoične kiseline (LTA) na ekspresiju receptora TLR2 i TLR4 te unutarstaničnog Hsp70, kao i na aktivaciju MAPK u 16HBE i NHBE stanicama humanog bronhijalnog epitela. Citotoksičnost je ispitana MTS testom nakon 24 h tretiranja stanica. Aktivacija i ekspresija MAPK (ERK i p38) te ekspresija unutarstaničnog Hsp70 određena je Western blot tehnikom nakon 30 minuta, 2 i 8 sati tretiranja, dok je ekspresija receptora TLR2 određena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) nakon 24 sata tretiranja. Rezultati pokazuju da CSE u nižim koncentracijama povećava vijabilnost 16HBE stanica, ali da je u višim koncentracijama smanjuje. Suprotno tome 15 % CSE povećao je vijabilnost NHBE stanica. Nadalje, u 16HBE stanicama ERK pokazuje aktivaciju nakon 30 minuta kod gotovo svih tretiranja, a nakon 8 sati se aktivira uz izlaganje nižoj koncentraciji CSE-a, LPS-u i LTA-u. CSE je u svim ispitivanim vremenima i koncentracijama doveo do povećane aktivacije p38, do čega je dovelo i 30-minutno izlaganje stanica LPS-u i LTA-u. Do smanjenja unutarstaničnog Hsp70 doveli su LPS i LTA, dok je CSE uglavnom povećavao njegovu ekspresiju. Na aktivaciju MAPK i ekspresiju Hsp70 u NHBE stanicama utjecao je samo 15 % CSE. U 16HBE stanicama LPS i LTA ne utječu značajno na mRNA ekspresiju receptora TLR2, dok je rhHsp70 smanjuje. S druge strane, rhHsp70 pokazuje sinergistički učinak s LPS-om i LTA-om na povećanje ekspresije mRNA za receptor TLR2 u odnosu na stanice tretirane samim LPS-om ili LTA-om. CSE povećava ekspresiju mRNA za receptor TLR2 u individualnim i u kombiniranim tretiranjima. Kombinirano tretiranje 15 % CSE-om i rhHsp70 pokazuje značajno smanjenje ekspresije mRNA za receptor TLR2. Ovo ukazuje na antagonistički učinak rhHsp70 i viših koncentracija CSE-a. U ovome istraživanju potvrđeno je citotoksično djelovanje viših koncentracija CSE-a, dok bi niže koncentracije CSE-a mogle uzrokovati poremećenu proliferaciju stanica plućnog epitela. Isto tako, rezultati

pokazuju da rhHsp70, LPS, LTA i CSE mogu aktivirati MAPK ovisno o vrsti stanica, koncentraciji te vremenu tretiranja. Nadalje, primijećeno je međudjelovanje rhHsp70 te LPS-a, LTA-a i CSE-a u modulaciji ekspresije mRNA za receptor TLR2. NHBE stanice pokazale su manju osjetljivost na primijenjena tretiranja u odnosu na 16HBE stanice.

Cigarette smoke is considered one of the main risk factors in the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Extracellular heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates inflammatory responses through activation of Toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4), followed by induction of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathways, including extracellular signal-regulated kinases (ERK) and p38. Contrary to this, intracellular Hsp70 has an anti-inflammatory role inside the cell. The aim of this study was to assess the effect of extracellular Hsp70, cigarette smoke extract (CSE), lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid (LTA) and their combinations on the expression of receptors TLR2 and TLR4 as well as intracellular Hsp70, and the activation of MAPKs in 16HBE and NHBE human bronchial epithelial cells. Cytotoxicity was determined by MTS viability assay after 24 h treatment. The activation of MAPKs (ERK and p38) and the expression of Hsp70 were determined by Western blot analysis after 30 min, 2 and 8 hours treatments. The expression of TLR2 was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) after 24 h treatment. The results indicate that lower doses of CSE increase the viability of 16HBE cells, but higher concentrations have a significant cytotoxic effect. 15% CSE increased the viability of NHBE cells. Furthermore, ERK was activated in 16HBE cells by almost all treatments after 30 minutes of exposure as well as by lower doses of CSE, LPS and LTA after 8 h of treatment. p38 was activated by LPS and LTA after 30 minutes as well as by CSE after all time periods examined. Hsp70 showed lower expression after being exposed to LPS and LTA, but CSE mostly increased its expression. In NHBE cells, 15% CSE was the only treatment that had any effect on the activation of MAPKs and expression of Hsp70. Neither LPS nor LTA had a significant effect on mRNA expression of receptor TLR2, while rhHsp70 caused its down-regulation. On the other hand, with rhHsp70 and LTA or LPS combined treatments a significant synergistic effect inducing an increase in mRNA expression of TLR2 was detected compared to untreated cells as well as to cells treated with LPS or LTA alone. CSE caused an increase in TLR2 mRNA expression after all treatments, but there was a suppressive antagonistic effect on TLR2 mRNA expression observed after combined treatment with 15% CSE and rhHsp70 when compared to untreated cells as well as cells treated with 15% CSE alone. Our results confirm the cytotoxic effects of higher concentrations of CSE, while lower concentrations of CSE could cause alterations in lung epithelial cells proliferation. In addition, results show that rhHsp70, LPS, LTA and CSE can activate MAPKs, and this was dependent on cell type, concentration, and duration of the

treatment. Furthermore, interactions of rhHsp70, LPS, LTA and CSE can modulate mRNA expression of TLR2. NHBE cells are less susceptible to applied treatments compared to 16HBE cells.

9. PRILOZI

9.1 Popis kratica

16HBE	humana bronhijalna epitelna stanična linija
ANOVA	jednosmjerna analiza varijance (<i>engl.</i> One Way Analysis of Variance)
ATP	adenozin-trifosfat
BSA	goveđi serumski albumin (<i>engl.</i> bovine serum albumin)
CAD	DNaza aktivirana kaspazama (<i>engl.</i> caspase-activated DNase)
CSE	ekstrakt dima cigareta (<i>engl.</i> cigarette smoke extract)
DAMP	molekularni obrazac oštećenja (<i>engl.</i> damage-associated molecular pattern)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt (<i>engl.</i> death inducing signaling complex)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
eHsp70	izvanstanični Hsp70
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalom (<i>engl.</i> extracellular signal-regulated kinase)
FADD	protein koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (<i>engl.</i> Fas-associated death domain)
FBS	fetalni goveđi serum (<i>engl.</i> fetal bovine serum)
FEV1	forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi (<i>engl.</i> forced expired volume in 1 second)
GOLD	globalna inicijativa za kroničnu opstruktivnu plućnu bolest (<i>engl.</i> Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
HBSS	Hankova uravnotežena otopina soli (<i>engl.</i> Hank's balanced salt solution)
Hsp	protein toplinskog šoka (<i>engl.</i> heat shock protein)

JNK	kinaza koja fosforilira N-terminalni dio transkripcijskog faktora c-Jun-a (engl. c-Jun N-terminal kinase)
KOPB	kronična opstruktivska plućna bolest
LPS	lipopolisaharid (engl. lipopolysaccharide)
LTA	lipoteikoična kiselina (engl. lipoteichoic acid)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom (engl. mitogen-activated protein kinase)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol
MyD88	čimbenik 88 mijeloidne diferencijacije (engl. myeloid differentiation factor 88)
NHBE	normalne humane bronhijalne epitelne stanice
NFκB	transkripcijski čimbenik nuklearnog faktora – κB
PAMP	molekularni obrazac povezan s patogenima (engl. pathogen-associated molecular pattern)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)
PRR	receptor za obrasce (engl. pattern recognition receptor)
qPCR	kvantitativni PCR (engl. quantitative PCR)
rhHsp70	rekombinantni humani Hsp70
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. reactive oxygen species)
SDS	natrij-dodecilsulfat
SDS-PAGE	diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TLR	receptor sličan Tollu (engl. Toll-like receptor)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze α (engl. tumor necrosis factor α)

TRIF

adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (engl. TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- β)

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

DJELOVANJE IZVANSTANIČNOG HSP70 I EKSTRAKTA DIMA CIGARETA NA AKTIVACIJU PROTEIN-KINAZA AKTIVIRANIH MITOGENOM TE NA EKSPRESIJU RECEPTORA 2 SLIČNOG TOLLU U UNUTARSTANIČNOG HSP70

Ida Žrvar

SAŽETAK

Dim cigareta smatra se jednim od glavnih čimbenika u razvoju kronične opstruktivske plućne bolesti (KOPB). Upalnom odgovoru pridonosi izvanstanični protein toplinskog šoka 70 (Hsp70) aktivacijom receptora 2 i 4 sličnih Tollu (TLR2 i TLR4), što dovodi do kaskadne aktivacije protein-kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK), poput protein-kinaza reguliranih izvanstaničnim signalima (ERK) i p38. Suprotno tome, unutarstanični Hsp70 potiskuje upalni odgovor. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj izvanstaničnog Hsp70, ekstrakta dima cigareta (CSE), lipopolisaharida (LPS) i lipoteikoične kiseline (LTA) na ekspresiju receptora TLR2 i TLR4 te unutarstaničnog Hsp70, kao i na aktivaciju MAPK u 16HBE i NHBE stanicama humanog bronhijalnog epitela. Citotoksičnost je ispitana MTS testom nakon 24 h tretiranja stanica. Aktivacija i ekspresija MAPK (ERK i p38) te ekspresija unutarstaničnog Hsp70 određena je Western blot tehnikom nakon 30 minuta, 2 i 8 sati tretiranja, dok je ekspresija receptora TLR2 određena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR) nakon 24 sata tretiranja. Rezultati pokazuju da CSE u nižim koncentracijama povećava vijabilnost 16HBE stanica, ali da je u višim koncentracijama smanjuje. Suprotno tome 15 % CSE povećao je vijabilnost NHBE stanica. Nadalje, u 16HBE stanicama ERK pokazuje aktivaciju nakon 30 minuta kod gotovo svih tretiranja, a nakon 8 sati se aktivira uz izlaganje nižoj koncentraciji CSE-a, LPS-u i LTA-u. CSE je u svim ispitivanim vremenima i koncentracijama doveo do povećane aktivacije p38, do čega je dovelo i 30-minutno izlaganje stanica LPS-u i LTA-u. Do smanjenja unutarstaničnog Hsp70 doveli su LPS i LTA, dok je CSE uglavnom povećavao njegovu ekspresiju. Na aktivaciju MAPK i ekspresiju Hsp70 u NHBE stanicama utjecao je samo 15 % CSE. U 16HBE stanicama LPS i LTA ne utječu značajno na mRNA ekspresiju receptora TLR2, dok je rhHsp70 smanjuje. S druge strane, rhHsp70 pokazuje sinergistički učinak s LPS-om i LTA-om na povećanje ekspresije mRNA za receptor TLR2 u odnosu na stanice tretirane samim LPS-om ili LTA-om. CSE povećava ekspresiju mRNA za receptor TLR2 u individualnim i u kombiniranim tretiranjima. Kombinirano tretiranje 15 % CSE-om i rhHsp70 pokazuje značajno smanjenje ekspresije mRNA za receptor TLR2. Ovo ukazuje na antagonistički učinak rhHsp70 i viših koncentracija CSE-a. U ovome istraživanju potvrđeno je citotoksično djelovanje viših koncentracija CSE-a, dok bi niže koncentracije CSE-a mogle uzrokovati poremećenu proliferaciju stanica plućnog epitela. Isto tako, rezultati pokazuju da rhHsp70, LPS, LTA i CSE mogu aktivirati MAPK ovisno o vrsti stanica, koncentraciji te vremenu tretiranja. Nadalje, primijećeno je međudjelovanje rhHsp70 te LPS-a, LTA-a i CSE-a u modulaciji ekspresije mRNA za receptor TLR2. NHBE stanice pokazale su manju osjetljivost na primijenjena tretiranja u odnosu na 16HBE stanice.

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

Rad sadrži: 58 stranica, 12 grafičkih prikaza i 90 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ekstrakt dima cigareta, MAPK, Hsp70, TLR2, TLR4, 16HBE, NHBE

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. Anita Somborac Bačura, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Daniela Jakšić, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Rujan 2019.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

EFFECT OF EXTRACELLULAR HSP70 AND CIGARETTE SMOKE EXTRACT ON ACTIVATION OF MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES AS WELL AS ON TOLL-LIKE 2 RECEPTOR AND INTRACELLULAR HSP70 EXPRESSION

Ida Žrvnar

SUMMARY

Cigarette smoke is considered one of the main risk factors in the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Extracellular heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates inflammatory responses through activation of Toll like receptors 2 and 4 (TLR2 and TLR4), followed by induction of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathways, including extracellular signal-regulated kinases (ERK) and p38. Contrary to this, intracellular Hsp70 has an anti-inflammatory role inside the cell. The aim of this study was to assess the effect of extracellular Hsp70, cigarette smoke extract (CSE), lipopolysaccharide (LPS), lipoteichoic acid (LTA) and their combinations on the expression of receptors TLR2 and TLR4 as well as intracellular Hsp70, and the activation of MAPKs in 16HBE and NHBE human bronchial epithelial cells. Cytotoxicity was determined by MTS viability assay after 24 h treatment. The activation of MAPKs (ERK and p38) and the expression of Hsp70 were determined by Western blot analysis after 30 min, 2 and 8 hours treatments. The expression of TLR2 was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) after 24 h treatment. The results indicate that lower doses of CSE increase the viability of 16HBE cells, but higher concentrations have a significant cytotoxic effect. 15% CSE increased the viability of NHBE cells. Furthermore, ERK was activated in 16HBE cells by almost all treatments after 30 minutes of exposure as well as by lower doses of CSE, LPS and LTA after 8 h of treatment. p38 was activated by LPS and LTA after 30 minutes as well as by CSE after all time periods examined. Hsp70 showed lower expression after being exposed to LPS and LTA, but CSE mostly increased its expression. In NHBE cells, 15% CSE was the only treatment that had any effect on the activation of MAPKs and expression of Hsp70. Neither LPS nor LTA had a significant effect on mRNA expression of receptor TLR2, while rhHsp70 caused its down-regulation. On the other hand, with rhHsp70 and LTA or LPS combined treatments a significant synergistic effect inducing an increase in mRNA expression of TLR2 was detected compared to untreated cells as well as to cells treated with LPS or LTA alone. CSE caused an increase in TLR2 mRNA expression after all treatments, but there was a suppressive antagonistic effect on TLR2 mRNA expression observed after combined treatment with 15% CSE and rhHsp70 when compared to untreated cells as well as cells treated with 15% CSE alone. Our results confirm the cytotoxic effects of higher concentrations of CSE, while lower concentrations of CSE could cause alterations in lung epithelial cells proliferation. In addition, results show that rhHsp70, LPS, LTA and CSE can activate MAPKs, and this was dependent on cell type, concentration, and duration of the treatment. Furthermore, interactions of rhHsp70, LPS, LTA and CSE can modulate mRNA expression of TLR2. NHBE cells are less susceptible to applied treatments compared to 16HBE cells.

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

Thesis includes: 58 pages, 12 figures and 90 references. Original is in Croatian language.

Keywords: cigarette smoke extract, MAPK, Hsp70, TLR2, TLR4, 16HBE, NHBE

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

The thesis was accepted: September 2019