Uloga inflamasoma, nekroptoze i piroptoze u kroničnoj opstrukcijskoj plućnoj bolesti

Marinić, Ivana

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:163:750739

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Ivana Marinić

Uloga inflamasoma, nekroptoze i piroptoze u kroničnoj opstrukcijskoj plućnoj bolesti

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019 .

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



Rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-1247.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na pruženoj pomoći, a posebno dragoj mentorici doc.dr.sc. Mariji Grdić Rajković na stručnom vodstvu, savjetima i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također veliko hvala asistentici dr.sc. Andrei Hulini-Tomašković na savjetima i pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada.

Želim se zahvaliti i svim svojim prijateljima koji su kraj mene bili uz smijeh i suze, ispite i provode i sve bitne trenutke tijekom mog studiranja. Hvala Vam što ste vjerovali u mene i gurali me naprijed.

Najveće hvala mojim najboljim roditeljima jer bez vas ne bih uspjela. Vi ste mi oslonac cijeli moj život pa tako i kroz ovih 5 godina studiranja. Hvala vam od srca šta ste uvijek puni ljubavi, razumijevanja i bezuvjetne podrške.

Na kraju, hvala dragom Bogu koji mi je dao strpljenja i mudrosti da privedem studij kraju te da krenem pravim putem kroz život.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Stanična smrt 2
1.1.1. Apoptoza 2
1.1.1.1 Apoptoza i KOPB 3
1.1.2. Nekroptoza 4
1.1.3. Piroptoza 5
1.2. Kaspaze 6
1.2.1. Kaspaza 1 6
1.3. Protein Hsp70 7
1.4. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture – PRRs 8
1.4.1. TLR 9
1.4.1.1. LPS i LTA – agonisti TLR receptora 10
1.4.1.2. Uloga TLR-a u KOPB-u 10
1.4.2. NLR 11
1.4.2.1. IL - 1β i IL – 18 11
1.5. Inflamasom 12
1.5.1. NLRP3 i KOPB 14
1.6. Kronična opstrukcijska plućna bolest - KOPB 14
1.6.1. Patogeneza KOPB-a 15
2. OBRAZLOŽENJE TEME 17
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. Uzgoj stanica 20
3.2. Određivanje broja stanica 20
3.3. Tretiranje stanica 21
3.3.1. Tretiranje stanica rekombinantinim humanim Hsp70 proteinom, LPS-om i LTA-om 21
3.3.2. Tretiranje stanica ekstraktom dima cigareta 21
3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze u mediju iznad stanica 22
3.5. Detekcija proteina Western blot metodom 22
3.5.1. Priprema staničnih lizata za Western blot analize 22
3.5.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu 23
3.5.3. Dentaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu 23
3.5.4. Western blot analiza 24
3.6. Detekcija mRNA metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. quantitative PCR, qPCR) 27
3.6.1. Izolacija RNA iz stanica 27
3.6.2. Sinteza cDNA 27
3.6.3. Određivanje ekspresije gena 28
3.7. Statistička obrada podataka 29
4. REZULTATI 30
4.1. Ispitivanje mehanizma djelovanja LPS – a, LTA, rhHsp70, CSE -a te njihovih kombinacija na 16 HBE stanice 31
4.1.1. Ispitivanje aktivacije NLRP3 31
4.1.1.1. Ekspresija mRNA za NLRP3 31
4.1.1.2. Ekspresija NLRP3 proteina 34
4.1.2. Ispitivanje ekspresije mRNA za IL-1β 36
4.1.3. Ispitivanje ekspresije mRNA za kaspazu-1 38

4.1.4. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH 41
4.1.5. Ispitivanje ekspresije proteina gasdermina D 43
4.1.6. Ispitivanje aktivnosti MLKL 44
4.1.7. Ispitivanje aktivnosti RIPK1 46
5. RASPRAVA 48
6. ZAKLJUČCI 52
7. LITERATURA 54
8. SAŽETAK / SUMMARY 61
9. PRILOZI 64
9.1. Popis kratica 65
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / 69
BASIC DOCUMENTATION CARD 69

1. UVOD

1.1. Stanična smrt

Stanična smrt proces je koji predstavlja krajnji i ireverzibilni ishod za oštećene stanice te stanice izložene smrtonosnim signalima. Riječ je o staničnom procesu koji ima ključnu ulogu u homeostazi organizma. Iz tog razloga, poremećajem regulacije stanične smrti može doći do pojave raznolikih bolesti. Nekoliko je oblika stanične smrti, poput apoptoze koja je programirana stanična smrt koja ne dovodi do upale ili nekroze koja rezultira izlijevanjem staničnog sadržaja što posljedično dovodi do upale (Vanden Berghe i sur., 2014; Duprez i sur., 2009).

1.1.1. Apoptoza

Apoptoza ili programirana stanična smrt je proces odgovoran za uklanjanje starih i oštećenih stanica kako bi se izbjegla neželjena aktivacija imunološkog sustava i upala. Postoje dva puta apoptoze, unutarnji te vanjski signalni put. Oba puta su povezana sa skupinom enzima nazvanih kaspaze te dovode do kondenzacije stanice, fragmentacije jezgre te stvaranja apoptoznih tjelešaca (Tummers i Green, 2017; Kennedy i sur., 2014).

Unutarnji ili mitohondrijski signalni put započinje tako da različiti unutarstanični signali potiču permeabilizaciju vanjske membrane mitohondrija te otpuštanje citokroma c. Citokrom c se zatim veže na aktivirajući faktor 1 koji aktivira apoptozne proteaze (Apaf-1, engl. apoptotic protease activating factor 1) i nastaje veliki proteinski kompleks–apoptosom koji dovodi do aktivacije kaspaze-9. Apoptosom sadrži citokrom c, Apaf-1, ATP te prokaspaze -9 koje se u njemu aktiviraju. Tako aktivirane kaspaze -9 dalje mogu aktivirati izvršne kaspaze -3, -7 i -6 (Kennedy i sur., 2014).

Vanjski signalni put započinje tako što se ligandi vežu na membranske receptore smrti koji su članovi TNF superporodice receptora, a neki od njih su: s FS-7 povezan površinski antigen (Fas, engl. FS-7-associated surface antigen, receptor 1 za čimbenik nekroze tumora (TNFR1, engl. tumor necrosis factor receptor) i receptor za TNF-povezani inducirajući ligand za apoptozu (TRAILR, engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor). Vezanje liganda na Fas ili TRAIL receptore dovodi do njihove trimerizacije i aktivacije, što potiče dolazak proteina koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (FADD, engl. Fas associated death

domain) na citosolnu stranu i sklapanje signalnog kompleksa koji potiče smrt (DISC, engl. death inducing signaling complex). DISC potiče prokaspaze -8 i -10 na autoaktivaciju kako bi one dalje aktivirale izvršne kaspaze (Tummers i Green, 2017; Kennedy i sur., 2014).

Najvažniju ulogu u regulaciji apoptoze imaju proteini iz Bcl-2 porodice. Članovi Bcl-2 porodice dijele se prema tome koje Bcl-2 homologne domene (BH) sadrže. Domene koje mogu sadržavati su BH1, BH2, BH3 i BH4. Proteini koji sadrže samo BH3 domenu djeluju pro-apoptozno. Glavni predstavnik ove podskupine je Bid. Međutim, iako su to pro-apoptozni proteini, oni su u zdravim stanicama neaktivni, a njihovu aktivaciju potiču signali smrti. Pro-apoptozno djeluju i proteini s tri BH domene (BH1, BH2 i BH3), a najznačajniji među njima su Bax, Bak i Bok.
Postoje i proteini koji sadržavaju sve četiri homologne domene, a njihovi predstavnici su Bcl-2, BclXL i Bcl-w. Oni djeluju anti-apoptozno tako što djeluju antagonistički na proteine s tri homologne domene, tj. čuvaju ih u inaktivnom obliku (Chan i Yu, 2004).

Od ostalih regulatora apoptoze bitno je napomenuti Hsp proteine. U većini slučajeva Hsp proteini su inhibitori apoptoze, međutim ovisno o vrsti stanice te o signalima koji djeluju na stanicu mogu djelovati i pro-apoptozno (Kennedy i sur., 2014).

1.1.1.1 Apoptoza i KOPB

Postoji korelacija između apoptoze i kronične opstrukcijske plućne bolesti (KOPB). Naime, poremećaj u ravnoteži apoptoze i proliferacije i diferencijacije stanica plućnog tkiva pogoduje razvoju KOPB-a. Postoje studije koje navode da su u pacijenata s KOPB-om pronađene endotelne i alveolarne epitelne stanice u apoptozi kao i povećanje ekspresije proteina iz Bcl-2 porodice, posebice Bax i Bad. Također je kod istih pacijenata utvrđena povećana aktivacija kaspaze-3 (Demedts i sur., 2006).

U plućima, kao i u većini drugih organa, postoje tkivni makrofagi koje u plućima nazivamo alveolarni makrofagi. Njihova je uloga prepoznavanje apoptoznih tjelešaca i njihovo eliminiranje iz tkiva. U KOPB-u je smanjena njihova učinkovitost što dovodi do sekundarne nekroze stanica u apoptozi te poticanja kronične upale (Grabiec i Hussell,2016).

1.1.2. Nekroptoza

Nekroza je neregulirana stanična smrt koju karakteriziraju morfološke promjene stanice kao što su povećavanje organela i jezgre, kondenzacija kromatina u male, nepravilne oblike te povećanje volumena same stanice što dovodi do pucanja stanične membrane. Važno je napomenuti da kod nekroze ne dolazi do fragmentacije stanice kao kod apoptoze, već do izlijevanja staničnog sadržaja u okolno tkivo što inducira upalni odgovor.
Nekroptoza je regulirani oblik nekroze, neovisan o kaspazama koji dovodi do upalnog odgovora.

Vezanjem faktora nekroze tumora-alfa (TNFα, engl. tumor necrosis factor alpha) za TNFR1 na staničnoj membrani dolazi do stvaranja TNFR1 kompleksa 1 čime počinje proces nekroptoze. TNFR kompleks 1 sadrži stanični protein 1 koji inhibira apoptozu (cIAP-1, engl. cellular inhibitor of apoptosis protein 1) i kinazu 1 koju aktivira transformirajući faktor rasta β (TAK1, engl. transforming growth factor-β-activated kinase 1). TNFR1 kompleks 1 prelazi u kompleks 2 djelovanjem deubikvintirajućeg enzima cilindromatoze (CYLD, engl. deubiquitinase cylindromatosis) dok djelovanjem poliubikvitarnog oblika dolazi do aktivacije jezgrinog faktora kappa B (NF-κB, engl. nuclear factor kappa B) što dovodi do sinteze pro-upalnih citokina.

Prelazak TNFR1 kompleksa 1 u kompleks 2 ključan je događaj u nekroptozi. Bitnu ulogu ima kaspaza-8. Ukoliko je ona aktivirana dolazi do apoptoze, no ukoliko se veže sa staničnim FLICE-sličnim inhibitornim proteinom ($cFLIP_L$, engl. cellular FLICE-like inhibitory protein) biva inhibirana te dolazi do aktivacije serin/treonin protein-kinaze 1 (RIPK1, engl. receptor-interacting serin/threonine protein-kinase). Aktivirani RIPK1 stupa u interakcije s RIPK3 preko receptorske homologne domene (RHD, engl. receptor homology domain) što dovodi do formacije nekrosoma.

Interakcije RIPK1 i RIPK3 dovode do fosforilacije proteina s inaktivnom kinaznom domenom koji je eksprimiran u različitim vrstama (MLKL, engl. mixed lineage kinase domain-like protein). MLKL zatim tvori tetramere i translocira se na staničnu membranu što potiče povećan ulazak kalcijevih iona u stanicu. Dodatno RIPK3 aktivira različite signale čime se povećava stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. reactive oxygen species) u mitohondrijima. (Dhuriya i Sharma, 2018; Zhao i sur.,2015; Vandenabeele i sur., 2010).

Nekroptoza je proces važan za shvaćanje KOPB-a. Naime, studije su pokazale da cigaretni dim uzrokuje povećanu ekspresiju RIPK3 u plućnim epitelnim stanicama (Mizumura i sur., 2014).

1.1.3. Piroptoza

Piroptoza je upalni oblik stanične smrti pokrenut aktivacijom inflamasoma, a koji štiti stanicu od patogena. Iako ima protektivnu ulogu, njena pretjerana aktivnost dovodi do sepse i letalnog septičkog šoka. Piroptoza je zasebni oblik stanične smrti, ali dijeli karakteristike s apoptozom i nekrozom. Karakteristike koje dijeli s nekrozom su bubrenje i liza stanice, dok s apoptozom dijeli fragmentaciju DNA (Aglietti i Dueber, 2017; Sharma i Kanneganti, 2016).
Mehanizam piroptoze započinje tako što receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR engl. nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor) bude podražen nekim signalom. Nakon toga dolazi do sklapanja inflamasoma koji uz NLR sadrži i adaptacijske molekule preko kojih se aktivira kaspaza 1. Aktivirana kaspaza 1 inicira upalni odgovor tako što kida upalne citokine pro-IL-1β i pro-IL-18, koji budu otpušteni nakon svoje aktivacije (Duprez i sur.,2009).

Kaspaza 1 djeluje i na protein gasdermin D (GSDMD) tako što ga kida na N- i C- terminalni fragment. N-terminalni fragment (GSDMD-NT) podliježe oligometizaciji te tvori pore u staničnoj membrani. S druge strane, uloga C-terminalnog fragmenta je kontrola aktivnosti N-terminalnog fragmenta, odnosno inaktivira ga tako što se veže na njega i tako mu onemogućuje formiranje pora.

Piroptoza ima ulogu u patogenezi KOPB-a. Naime, povećana koncentracija kaspaze 1 dovodi do indukcije piroptoze čime se pojačava kronični upalni odgovor (Liu i Lieberman, 2017; Aglietti i Dueber, 2017; Sharma i Kanneganti, 2016; Vande Walle i Lamkanfi, 2016; Bergsbaken i sur., 2009).

1.2. Kaspaze

Kaspaze odnosno cistein-ovisne aspartat-specifične proteaze enzimi su važni u kontroli i procesu stanične smrti. U ljudi je otkriveno 12 vrsta kaspaza, a njih 7 je bitno za apoptozu. Sve kaspaze su eksprimirane kao zimogeni odnosno prokaspaze i dijele ključne strukturne karakteristike. Sadrže NH_2-terminalnu pro-domenu te katalitičku domenu koja se sastoji od velike i male podjedinice. Prokaspaze se aktiviraju na način da tvore dimere koji se potom autoproteolitički aktiviraju. Taj aktivni heterodimer ima dva aktivne mjesta tako što svako aktivno mjesto potječe od jedne kaspaze. Iznimka od ovog strukturalnog obrasca je kaspaza 9 koja ima samo jedno aktivno mjesto.

Kaspaze su enzimi koji hidroliziraju peptidnu vezu i to nakon aspartatnog ostatka. Taj aspartatni ostatak se uobičajeno nalazi kraj neke male ili nenabijene aminokiseline kao što su alanin, serin ili glicin. Aktivno mjesto na koje se supstrat veže oblikovano je od aminokiselinskih ostataka velike i male katalitičke podjedinice. Kao nukleofili u aktivnom mjestu nalaze se cistein te histidinski imidazolni prsten koji je dio velike katalitičke podjedinice (Würstle i sur., 2012).

1.2.1. Kaspaza 1

Kaspaza 1 je enzim koji se aktivira u inflamasomu kao odgovor na patogene ili endogene medijatore. Najvažnija funkcija aktivne kaspaze 1 je kidanje pro-citokina IL-1β i IL-18 čime se oni aktiviraju. Otkriveno je da postoji još supstrata za kaspazu 1, između ostalih i gasdermin D.

Proteini nužni za mitohondrijsko disanje i glikolizu su potencijalne mete kaspaze 1 što može dovesti do smrti stanice. Nadalje, njena aktivacija može dovesti do povećanja sinteze masnih kiselina i kolesterola potrebnih za popravak membrane, ukoliko je ona napadnuta od strane patogena. Kaspaza 1 je važna u borbi protiv patogena tako što potiče lizosomalnu degradaciju patogena (Sun i Scott, 2016; Sollberger i sur., 2014).

1.3. Protein Hsp70

Proteini toplinskog šoka (Hsp, engl. heat shock proteins) skupina su proteina koju možemo pronaći u prokariota, eukariota pa čak i biljaka. Zovu se proteini toplinskog šoka jer je glavni uzrok staničnog stresa koji potiče ekspresiju Hsp-a upravo toplinski šok. Istraženi su i drugi uzročnici staničnog stresa između kojih su oksidativni stres, deficijencija nutrijenata, ultraljubičasto zračenje, izlaganje kemikalijama, virusne infekcije te ishemija.
Drugi naziv za proteine toplinskog šoka su šaperoni. Njihova uloga kao šaperona je u fiziološkim uvjetima, nadziranje sastavljanja, stabilizacije, slaganja i translokacije oligomernih proteina te sprječavanje denaturacije proteina.
Proteini toplinskog šoka grupirani su u porodice obzirom na njihovu molekulsku masu. Primjerice, oni veličine približno 60 kDa smješteni su u Hsp60 porodicu (Borges i sur., 2012; Pockley, 2003).

Hsp70 protein dio je Hsp70 porodice s molekulskom masom od 72 kDa. Riječ je o inducibilnom proteinu, proteinu koji je povećano eksprimiran prilikom staničnog stresa. Njegova uloga je održavanje stabilnosti prilikom sklapanja proteina ili prilikom interakcije proteina sa stanicom te inhibicija agregacije proteina. Uz to, Hsp70 djeluje citoprotektivno tako što inhibira razne signalne puteve, uključujući NF-κB signalni put. Inhibicijom signalnih puteva sprječava odgovor stanice na pro-upalne citokine (Sevin i sur., 2015; Giffard i sur., 2008).

Uz to, Hsp 70 djeluje kao inhibitor apoptoze. Naime, utječe na apoptozu interakcijom s ko-šaperonom Bag-1 za koji je poznato da je u interakciji s antiapoptotičkim proteinom bcl-2. Povišene razine Hsp 70 štite stanicu od citotoksičnosti uzrokovane pro-apoptotičkim čimbenicima kao što su: TNF, radijacijski i kemoterapeutski agensi te monociti. Hsp70 djeluje inhibicijski na apoptozu i tako što se izravno veže na faktor 1 Apaf-1 čime je onemogućeno stvaranje funkcionalnog apoptosoma (Sharma i Masison, 2009).

Hsp70 uobičajeno nalazimo u citoplazmi, međutim postoji i izvanstanični oblik, eHsp70 (engl. extracellular Hsp70). Taj izvanstanični oblik može biti izlučen kao rezultat nekroze ili lize stanice i tada govorimo o pasivnom putu oslobađanja. S druge strane, aktivni put oslobađanja povezan je s egzocitozom te ne uključuje oštećenja tkiva ili staničnu smrt.

Nakon otpuštanja eHsp70, poveća se njegova koncentracija što služi kao „znak opasnosti“. Zatim se eHsp70 veže na receptore na stanicama imunološkog sustava što ih aktivira i time započinje imunosni odgovor (Johnson i Fleshener, 2006; Asea i sur., 2000).

Djelovanje eHsp70 ovisi o kontekstu, odnosno u fiziološkim uvjetima eHsp70 pomaže imunološkom sustavu, dok u patofiziološkim stanjima pogoršava upalu. Upravo zato što Hsp70 ima imunomodulacijsko djelovanje, pripada skupini molekula nazvanih molekularni obrasci oštećenja (DAMP, engl. damage associated molecular pattern). Radi se o endogenim molekulama koje pri normalnim uvjetima nalazimo unutar stanice, no kada dođe do staničnog stresa prelaze u izvanstanični prostor te tamo budu prepoznate kao „signal opasnosti“. Zatim pokreću sterilnu upalu–proces upale kod kojeg nemamo patogene (Hulina, 2018).

Hsp70 ima svoju ulogu i u patogenezi KOPB-a. Naime, studije su pokazale da je povećana koncentracija Hsp70 u plazmi povezana s povećanim rizikom za razvoj KOPB-a (Qu i sur., 2015).

1.4. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture – PRRs

Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRR engl. pattern recognition receptor) imaju važnu ulogu u detekciji i odgovoru na patogene, tj. imaju ulogu u imunosnom sustavu. PRR-ovi se mogu podijeliti u nekoliko skupina: receptori slični Tollu (TLRs, engl. Toll-like receptors), lektinski receptori C-tipa, NLR receptori, receptori slični genu 1 koji je induciran retinoičnom kiselinom (RIG-1Rs, engl. retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors) te receptor krajnjih produkata uznapredovale glikacije (RAGE, engl. receptor for advanced glycation end-products).

KOPB kronična je upalna bolest pluća u kojoj je velika uloga imunološkog sustava koji djeluje upravo preko PRR-ova. Ovi receptori nalaze se na imunosnim i epitelnim stanicama te potiču imunosni odgovor nakon što se na njih vežu molekularni obrasci povezani s patogenima (PAMPs, engl. pathogen-associated molecular patterns) ili molekularni obrasci oštećenja (DAMP). Kada se ti molekularni obrasci vežu na PRR dolazi do stvaranja upalnih citokina kao što su interferon (IFN) te kemokini. Navedeni citokini nadalje aktiviraju okolne stanice te povećavaju regrutaciju makrofaga i neutrofila. PRR-ovi na makrofagima i

dendritičkim stanicama osiguravaju daljnji signal za aktivaciju T-staničnog odgovora. Upravo ovi mehanizmi objašnjavaju zašto su PRR-ovi ključni u akutnim infekcijama respiratornog trakta, odnosno kod egzarebacije KOPB-a (Pouwels i sur., 2014; Bezemer i sur., 2012; Opitz i sur., 2010).

1.4.1. TLR

Receptori slični Tollu (TLRs) transmembranski su proteini s izvanstaničnom leucin-bogatom domenom (LRR, engl. leucine-rich repeat) te citoplazmatskom karboksi terminalnom domenom homolognoj Tollu i receptoru za interleukin-1 (TIR, engl. Toll-interleukin 1 receptor homology domain). Prema smještaju mogu se podijeliti na one koji se nalaze na staničnoj membrani (TLR 1,2,4,5 i 6) i na one koji se nalaze na membrani lizosoma ili endosoma (TLR 3,7,8 i 9). TLR-ovi prepoznaju PAMP-ove, koji potiču od egzogenih patogena, te DAMP-ove koji bivaju izlučeni iz oštećenog tkiva. Vezanjem ovih molekulskih obrazaca na TLR, dolazi do aktivacije signalnih puteva koji posljedično aktiviraju transkripcijske faktore, kao što su NF-κB ili faktor regulacije interferona 3 (IRF3, engl. interferon regulatory factor 3). Sve to rezultira transkripcijom gena za pro-upalne citokine kao što su interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), TNF-α te interferon γ. (Molteni i sur., 2016; Mukherjee i sur., 2016; Lorne i sur., 2010; Sandor i Buc, 2005).

Prvi otkriveni TLR bio je TLR4, a njegov prvi otkriveni ligand, odnosno PAMP je lipopolisaharid (LPS), komponenta staničnog zida Gram-negativnih bakterija. Vezanjem LPS-a na TLR4 dolazi do aktivacije transkripcijskih faktora i ekspresije gena kontroliranih tim faktorima, najčešće upalnih citokina. Uz bakterijski LPS, TLR4 veže i ligande povezane s virusima te endogene molekule domaćina poput fibrina, oligosaharidnih fragmenata hijaluronana, polisaharidnih fragmenata heparan sulfata te Hsp60 i Hsp70.

TLR2 receptor prepoznaje širok raspon različitih molekula, od bakterijskih, virusnih pa čak i onih poteklih od parazita. Što se tiče bakterijskih molekula, TLR2 prepoznaje peptidoglikane i lipoteikoičnu (LTA) kiselinu iz staničnog zida Gram-pozitivnih bakterija te lipoproteine iz staničnog zida Gram-negativnih bakterija. Nadalje, prepoznaje glikolipide iz stanične membrane parazita, mnoštvo virusnih molekula te LPS. Naime, neke tipove LPS ne može prepoznati TLR4, već TLR2. Uz sve te egzogene, prepoznaje i endogene molekule poput Hsp70 i hijaluronske kiseline. Vezanjem bilo kojeg liganda dovodi do aktivacije

transkripcijskih faktora što rezultira povećanom ekspresijom upalnih citokina i ostalih molekula bitnih u upali (Sandor i Buc, 2005).

1.4.1.1. LPS i LTA – agonisti TLR receptora

Lipopolisaharid (LPS) i lipoteikoična kiselina (LTA) su PAMP-ovi koji djeluju agonistički na TLR receptore.

LPS je glikolipid građen od tri domene; O-bočnog lanca, sržne domene te lipida A. Lipid A je PAMP kojeg prepoznaju stanice preko kompleksa sastavljenog od mijeloidnog diferencijacijskog faktora 2 (MD2, engl. myeloid differentiation factor 2) i TLR4. Protein koji veže LPS (LBP, engl. LPS binding protein) te membranske i topljive forme biljega diferencijacije 14 (CD14, engl. cluster of differentiation), vežu LPS u izvanstaničnom prostoru i imaju ključnu ulogu u predstavljanju LPS-a kompleksu MD2 i TLR4. Nakon što je LPS predstavljen kompleksu te nakon vezanja na MD2 dolazi do konformacijskih promjena u TLR4 pri čemu on dimerizira ili oligomerizira te tako aktivira signale koji se prenose u unutrašnjost stanice (Bohannon i sur., 2013).

LTA je amfifilni adhezin koji je sastavljen od ponavljajućih polimernih i glikolipidnih jedinica te dijeli patofiziološka svojstva s LPS-om. U cirkulaciji LTA formira kompleks s LBP-om koji se zatim veže na CD14, čime se aktivira signalizacija putem TLR4 slično kao kod signalizacije potaknute LPS-om. Osim s LBP-om, LTA može formirati kompleks i s proteinom B1 iz grupe proteina velike mobilnosti (HMGB1, engl. high mobility group box 1 protein) koji dalje aktivira signalne putove i transkripcijske faktore koji dovode do upalnog odgovora (Kwak i sur., 2015).

1.4.1.2. Uloga TLR-a u KOPB-u

Najbolje opisani faktor rizika za KOPB je cigaretni dim. On, preko TLR receptora smještenih na stanicama pluća te imunosnim stanicama, potiče upalu. Naime, aktivacijom TLR receptora, te kasnije aktivacijom transkripcijskih faktora povećava se sinteza upalnih citokina. Uz to sastavnice cigaretnog dima same povećavaju broj aktiviranih makrofaga što zajedno dovodi do hipersekrecije mukoze, oslabljene mukocilijalne funkcije i upale koja može dovesti do

oštećenja plućnog tkiva. Nadalje, oslabljena funkcija TLR receptora može dovesti do egzacerebacija, a prekomjerna aktivnost može dovesti do oštećenja tkiva. Neke molekule iz oštećenog tkiva, poput razgrađene hijaluronske kiseline, mogu djelovati poput DAMP-ova koji se vežu na TLR-ove čime se dodatno aktivira imunosni odgovor (Bezemer i sur., 2012).

1.4.2. NLR

NLR receptori su unutarstanični PRR receptori. Porodica NLR receptora (njih 22 člana u ljudi) prepoznaje različite PAMP i DAMP molekule. Ovi receptori građeni su od C-terminalne domene bogate leucinom (LRR) koja ima ulogu vezanja liganda i od središnje NACHT oligomerizacijske domene koja veže nukleotide (NOD, engl. nucleotide-binding oligomerization domain). Na N-terminalnom kraju NLR receptora mogu biti mnoge različite domene koje vežu efektorske molekule. Vezanje različitih efektorskih molekula dovodi do aktivacije različitog signalnog puta.

Receptor koji je građen od NACHT, LRR i PYD domene (NLRP, engl. NACHT, LRR and PYD-containing protein) je član podskupine NLR receptora koji na svom N-terminalnom kraju imaju pirinsku domenu (PYD, engl. pyrin domain). Takvi NLRP receptori mogu sklapati multiproteinske komplekse–inflamasome. Najpoznatiji primjer takvog receptora je NLRP3 (od engl. NOD-like receptor pyrin 3), koji tvori NLRP3 inflamasom.
Svi članovi NLR porodice imaju ključnu ulogu u detekciji potencijalno štetnih stimulansa u citosolu, te posljedično indukciju aktivacije IL-1β i IL-18 (Pinkerton i sur., 2017).

1.4.2.1. IL - 1β i IL – 18

Interleukin-1β (IL-1β) je potentan, pro-upalni citokin koji ima važnu ulogu u pokretanju upalnog odgovora. Razne infekcije, štetni učinci te znakovi oštećenja stanice aktiviraju PRR receptore u plućima. Tom aktivacijom inducira se transkripcija inaktivne forme ovog citokina, tzv. pro-IL-1β. Ovaj neaktivni oblik sintetiziran je uglavnom u makrofagima, ali može biti sintetiziran i u neutofilima, limfocitima, fibroblastima te endotelnim stanicama dišnog sustava. Kako bi nastao biološki aktivan IL-1β, pro-oblik se proteolitički kida, a zatim se aktivni citokin otpušta izvan stanice. Jednom otpušten, IL-1β pronalazi receptor 1 za IL-1(IL-

1R1, engl. IL-1 receptor 1) te se veže na njegovu izvanstaničnu domenu kako bi ispoljio svoje upalne učinke–bilo autokrino ili parakrino.

Kod pacijenata oboljelih od KOPB-a, povišena je razina IL-1β te je utvrđeno da je njegova koncentracija proporcionalna s težinom bolesti, kao i smanjenje razine IL-1 receptora te antagonista tog receptora.
Nadalje, kod oboljelih je uočeno da IL-1β djeluje na makrofage što dovodi do otpuštanja raznih upalnih citokina i kemokina iz njih. Osim toga, IL-1β potiče leukocitozu tako što inducira otpuštanje neutrofila iz koštane srži i raznih citokina iz ostalih stanica. Sve to dovodi do proliferacije fibroblasta, povećane sekrecije prostaglandina i kolagenaza te povećane sinteze fibronektina i kolagena (Pinkerton i sur., 2017; Sapey i sur., 2009; Culpitt i sur., 2003; Chung i sur., 2001).

Još je jedan bitan citokin u razjašnjavanju patofiziologije KOPB-a. Riječ je o interleukinu 18 (IL-18). Eksprimiran je konstitutivno u mezenhimskim stanicama, dok se njegova aktivacija zbiva u makrofagima i dendritičkim stanicama. Aktivacija je potrebna jer se kao i IL-1β sintetizira kao inaktivni oblik (pro-IL-18). Aktivni oblik bitan je u borbi protiv patogena jer ovisno o tome koji se citokini nalaze u okolini, IL-18 može aktivirati Th1 ili Th2 imunosni odgovor. Sudjeluje i u borbi protiv virusa tako što inducira IFN-γ, te je stoga i originalno nazvan IFN-γ inducirajući faktor. Što se tiče KOPB-a, uočeno je da je aktivnost IL-18 povezana s tijekom bolesti (Dinarello i sur., 2013; Sawada i sur., 2013; Imaoka i sur., 2008; Nakanishi i sur., 2001; Okamura i sur., 1995).

1.5. Inflamasom

Inflamasomi su multimerni kompleksi formirani kao odgovor na različite fiziološke i patogene stimulanse. Aktivacija inflamasoma ključna je za uklanjanje patogena ili oštećenih stanica. Inflamasomi su građeni od receptora te od enzimske komponente (kaspaza-1) te se obzirom na vrstu receptora dijele na inflamasome s receptorom sličim oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (NLR) te na inflamasome s receptorom sličnom proteinu 2 odsutnom u melanomu (ALR, engl. absent in melanoma 2-like receptor). Uz receptor i kaspazu-1, mnogi inflamasomi sadrže i adaptacijsku molekulu koja se nalazi između ta dva dijela. Ta adaptacijska molekula je protein nalik mrljama povezan s apoptozom koji sadrži

domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza (ASC, engl. apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain) (Sharma i Kanneganti, 2016).

NLRP3 je NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3. Na stanicama mijeloidne loze je konstantno eksprimiran, ali postoje molekule poput LPS-a i TNF-α koje mogu potaknuti njegovu ekspresiju. To poticanje ekspresije naziva se primarni ili prvi signal, a osim što potiče ekspresiju NLRP3, inducira i sintezu pro-oblika IL-1β i IL-18. Povećana sinteza pro-oblika navedenih molekula povećava osjetljivost NLRP3 za tzv. sekundarni ili drugi signal. Drugi signal mogu biti različiti PAMP-ovi, toksini iz bakterija, virusi, gljivice ili paraziti i njihove molekule kao i razni DAMP-ovi. Isto tako, aktivaciju NLRP3 mogu potaknuti i različite promjene i stanja u stanici kao što su stvaranje ROS-a, promjene u staničnom volumenu, lizosomski poremećaji, izlučivanje kalija te poremećaji u signalizaciji putem kalcija. Mehanizam aktivacije NLRP3 nije u potpunosti objašnjen, međutim svi ovi signali su zapravo signali staničnog stresa te se pretpostavlja da bi aktivacija NLRP3 mogla biti senzor oštećenja stanice (Sharma i Kanneganti, 2016; Man i Kanneganti, 2015; de Zoete i sur., 2014).

Postoje dva puta kojima se inflamasom može aktivirati: kanonski i nekanonski put aktivacije. Kanonski put aktivacije počinje tako da se kaspaze-1 vežu na receptore inflamasoma. Receptori imaju domene na koje se izravno mogu vezati kaspaze. Ukoliko takvo vezanje nije moguće, kaspaze se vežu na receptor preko adaptacijske molekule ASC. ASC molekule sadrže pirinske domene kojima se vežu na pirinske domene na receptorima. Tim povezivanjem dolazi do stvaranja dugih filamenata tj. žarišta u kojima će doći do aktivacije kaspaza-1 nakon što se one vežu. Kaspaze-1 vežu se na ASC preko N-terminalne domene za aktivaciju i privlačenje kaspaza (CARD, engl. caspase activation and recruitment domain). Nakon što se veže velik broj kaspaza, doći će do njihove dimerizacije, zatim autoproteolitičkog kidanja, odnosno aktivacije. Aktivirane kaspaze sada aktiviraju pro-citokine IL-1β i IL-18 te dovode do piroptoze (Sharma i Kanneganti, 2016; Man i Kanneganti, 2015).

Drugi put aktivacije inflamasoma je nekanonski put aktivacije. On se aktivira u prisutnosti LPS ili unutarstaničnih bakterija u citosolu. Prisutnost tih agenasa uzrokuje aktivaciju kaspaze -4 i -5. Ove kaspaze ne kidaju izravno pro-oblike citokina IL-1β i IL-18 kao kaspaza 1. One

djeluju tako što iniciraju piroptozu te lučenje upalnog citokina IL-1α (Xu i sur., 2018; Man i Kanneganti, 2015).

1.5.1. NLRP3 i KOPB

U mnogim upalnim bolestima pluća, pa tako i u KOPB-u, uočena je aktivacija NLRP3 inflamasoma. Adaptacijske molekule (ASC) pronađene su u povećanom broju u plućima pacijenata koji boluju od KOPB-a, a kako su adaptacijske molekule bitan dio inflamasoma, zaključilo se da je povećana i aktivacija samih inflamasoma. Međutim, studije su pokazale da ne dolazi do prevelike aktivacije NLRP3 inflamasoma u pacijenata čija je bolest kontrolirana, nego se porast aktivacije povezuje s egzacerbacijama bolesti. Naime, tijekom egzacerbacije povećane su koncentracije kristala mokraćne kiseline, izvanstaničnog ATP-a, reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) kao i PAMP molekula. Upravo te molekule su aktivatori NLRP3 inflamasoma. Što se tiče ostalih upalnih parametara, kod pacijenata s KOPB-omom povećana je razina IL-1β i IL-18. Također je uočena povećana koncentracija kaspaze-1 kod pacijenta koji su pušači (Barnes, 2016; Brusselle i sur., 2014).

1.6. Kronična opstrukcijska plućna bolest - KOPB

KOPB je karakterizirana trajnim respiratornim simptomima i ograničenjem protoka zraka koje nastaje zbog poremećaja dišnih putova ili alveola. Do tih poremećaja dolazi uslijed izlaganja štetnim česticama ili plinovima. Kronično ograničenje prohodnosti dišnih puteva koje je jedna od karakteristika KOPB-a, uzrokovano je kombinacijom bolesti malih dišnih putova (npr. opstruktivni bronhiolitis) te razaranjem parenhima (emifezem). Kronična upala dovodi do strukturnih promjena, sužavanja malih dišnih putova te uništavanja plućnog parenhima. Sve to dovodi do gubitka alveolarne povezanosti s malim dišnim putevima te smanjenja plućne elastičnosti, što znači da je smanjena sposobnost dišnih putova da budu otvoreni tijekom izdisaja (GOLD, engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases, 2017).

KOPB se u različitim razmjerima pojavljuje na različitim područjima te u različitim skupinama ljudi koji nastanjuju isto područje. Iz toga proizlazi da ovisno o tome kakvim je štetnim česticama ili plinovima određena populacija izložena, takva je i učestalost pojave

KOPB-a. Uz izlaganje štetnim agensima, uzrokom KOPB-a smatra se i kombinacija raznih drugih faktora kao što su genetika, izloženost majke štetnim tvarima tijekom trudnoće, slabiji razvoj pluća nakon rođenja te općenito preosjetljivost dišnog sustava (Lange i sur., 2015; Stern i sur., 2007; Tashkin i sur., 1992).

Plinovi i štetne čestice dospijevaju u pluća samim udisanjem. Studije su pokazale da je njihova koncentracija znatno veća u urbanim sredinama. Velika je opasnost i od štetnih čimbenika koji nastaju u zatvorenim prostorima, primjerice izgaranje biomasa i ugljena u pećima u kućanstvima za grijanje i kuhanje. Nadalje, rizične su i skupine ljudi koje su izložene štetnim tvarima na radnome mjestu, npr. u raznim industrijama. Iako su svi ovi faktori ozbiljni, najrizičniji čimbenik za razvoj KOPB-a je pušenje duhana, bilo aktivno ili pasivno (Viegi i sur., 2007).

Što se genetskih čimbenika tiče, najbolje je opisan deficit α1-antitripsina, čija je glavna uloga zaštititi pluća od neutrofilne elastaze koja proteolitički uništava plućno tkivo (Stoller i sur., 2005).

Uz sve navedeno, smatra se da su dob i spol bitni čimbenici rizika. Uočeno je da je stopa pojavljivanja KOPB-a povećana kod starijih osoba, ali nije razjašnjeno je li u pitanju samo starenje ili duži vremenski period u kojem su pojedinci bili izloženi štetnim učincima. Starije studije su pokazale da su muškarci ti koji češće obolijevaju dok novija istraživanja pokazuju da je učestalost razvoja KOPB-a ista u oba spola. Kao razlog tome navodi se činjenica da je danas više žena koje puše nego u vrijeme kad su starija istraživanja provođena (Mercado i sur., 2015; Landis i sur., 2014).

1.6.1. Patogeneza KOPB-a

Prethodno navedeni čimbenici rizika, posebno pušenje duhana dovode do razvoja KOPB-a. U plućima dolazi do patoloških promjena iz kojih se razvija upala što kulminira oštećenjem plućnog tkiva. Daljnje izlaganje štetnim tvarima povećava upalu te se vremenom razvija kronična upala.

Udisanjem stranih čestica i štetnih plinova dolazi do upalnog odgovora, odnosno infiltracije upalnih stanica kao što su limfociti, makrofagi te aktivirani neutrofili. Ove stanice zatim luče niz enzima i citokine koji uništavaju plućni parenhim. Nadalje, udahnute štetne tvari mogu biti ili sadržavati oksidanse ili PAMP molekule koje aktiviraju NF-κB. Aktivirani NF-κB djeluje tako da aktivira svoj signalni put, a time i upalni odgovor.

Kao što je već spomenuto upala kulminira oštećenjem plućnog tkiva. U KOPB-u dolazi do neravnoteže između oštećenja i obnavljanja tkiva. Obzirom da je sposobnost regeneracije plućnog tkiva nedostatna, prevladava oštećeno tkivo. Upravo je oštećen plućni parenhim glavna patogenska karakteristika KOPB-a.

Kako bolest sve više napreduje, dolazi do povećane aktivacije i sinteze pro-upalnih citokina. Također, dolazi do prijelaza makrofaga iz M1 u M2 tip. M2 tip makrofaga potiče fibrozu koja najviše utječe na najuže dijelove dišnog sustava.
Bolest se može pogoršati ukoliko pacijent boluje od neke, bilo bakterijske ili viruse infekcije. Infekcije dovode do egzacerbacije bolesti te pojačane upale što dovodi do još jačeg oštećenja plućnog parenhima.

Uz samo oštećenje plućnog tkiva dolazi i do promjene u strukturi istog. Naime, kolagen iz tkiva se zamjenjuje elastinom.
Oštećenje tkiva, kao i pripadajućih epitelnih i alveolarnih stanica dovodi do aktivacije imunosnog sustava. Oštećene stanice otpuštaju antigene, koje imunološki sustav prepoznaje kao strane te se pokreće imunosni tj. upalni odgovor.

Iako se naziva kronična opstrukcijska plućna bolest, KOPB se manifestira i u drugim dijelovima tijela. U koštanoj srži dolazi do smanjene hematopoeze, mišićno tkivo je oslabljeno čime je smanjena mogućnost fizičke aktivnosti te dolazi do slabljenja regeneracije u krvožilnom sustavu. Upravo zbog manifestacije u drugim organskim sustavima, KOPB se smatra sistemskom upalnom bolešću (Tuder i Petrache, 2012; Fischer i sur., 2011; MacNee, 2005).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kronična opstruktivna bolest pluća je bolest karakterizirana respiracijskim simptomima i ograničenim protokom zraka. Plinovi te sitne male čestice kao i cigaretni dim najčešći su uzroci KOPB-a. Oni dovode do kronične upale dišnih puteva, zatim razaranja plućnog tkiva te na posljetku do nemogućnosti popravka tkiva. Zbog mogućih čestih egzacerbacija i komorbiteta KOPB je vrlo opasan za život.

Cilj ovog rada bio je ispitati učinke rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a kao i kombinacija LPS-a, LTA i CSE-a s rhHsp70 na 16-HBE stanice (humane bronhijalne epitelne stanice).

Također smo željeli utvrditi da li i u kojim koncentracijama rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE te kombinacije LPS, LTA i CSE s rhHsp70 rezultiraju s aktivacijom NLRP3 inflamasoma, piroptoze i nekroptoze u ovim stanicama.

U radu će se mjerenjem ekspresije mRNA za NLRP3, IL-1β i kaspazu-1, te određivanjem prisustva NLRP3 u stanicama ispitati prisutnost upale kao i aktivacija inflamasoma.

Nadalje, da si se utvrdilo je li u stanicama došlo da aktivacije nekroptoze i piroptoze, u mediju iznad stanice određivat će se katalitička aktivnost enzima laktat dehidrogenaze kao i ekspresija i aktivacija RIPK1 i MLKL te ekspresija gasdermina D.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzgoj stanica

16-HBE 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.

Uzgajaju se u EMEM mediju (Lonza Group Ltd., Švicarska) s 10 % FBS-a, 1 % antibiotikom i antimikotikom, u bocama za uzgoj staničnih kultura od 25 cm^2 prethodno obloženima s kolagenom (3 mg/mL; Inamed, SAD) te se nakon postignute konfluentnosti od oko 90 % nasađuju na odgovarajuće ploče s 24 jažice koje su također obložene na isti način kao i boce za uzgoj staničnih kultura.

16-HBE stanice se nakon što postignu oko 90 % konfluentnosti isperu s 5 mL HBSS otopinom (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 % CO_2. Nakon toga odsiše se HBSS vakuum sisaljkom i stanice se isperu s 1,5 mL 0,25 % otopinom tripsin-EDTA, zatim im se ponovno dodaje 1,5 mL 0,25 % otopine tripsin-EDTA na 60 sekundi te se nakon toga isti odsiše vakuum sisaljkom. Stanice se inkubiraju 5-10 minuta na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2 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, 1 % antibiotikom i antimikotikom. Nakon što stanice postignu oko 95 % konfluentnosti promijeni se medij u EMEM bez FBS-a (Lonza Group Ltd., Švicarska) s kojim se stanice inkubiraju preko noći prije izvođenja pokusa. Sva tretiranja na 16 - HBE stanicama vrše se u EMEM-u bez FBS-a.

3.2. Određivanje broja stanica

Nakon što se stanice resuspendiraju u 1 mL medija za uzgoj stanica doda im se 0,4 % otopine triptanskog plavila u omjeru ovisno o vrsti stanica. Nakon inkubacije 2 minute, 10 μL otopine prenese se u Neubaurerovu komoricu te se stanice broje pod invertnim mikroskopom na povećanju 400 puta. Otopina triptanskog plavilo koristi se kako bi se razlikovale mrtve i žive stanice. Naime, žive stanice ga izlučuju uz pomoć membranskih pumpi, stoga su žive stanice

neobojane. S druge strane, mrtve stanice ne mogu izbaciti triptansko plavilo te se ono nakuplja u njima. Kao rezultat, mrtve stanice se vide kao obojene tj. plave stanice.

Neubauerova komorica sadrži 9 kvadrata čiji su volumeni 0,0001 mL. Ti kvadrati podijeljeni su na manje kvadrate. Brojanje stanica vrši se u 4 rubna kvadrata te se naposlijetku broj stanica izračuna prema formuli:
broj stanica/mL = srednja vrijednost broja stanica u 4 rubna kvadrata x razrjeđenje / 0,0001

3.3. Tretiranje stanica

3.3.1. Tretiranje stanica rekombinantinim humanim Hsp70 proteinom, LPS-om i LTA-om

Rekombinatni humani Hsp70 protein (rhHsp70) kojim su tretirane stanice sintetiziran je u bakteriji *E.coli* s niskim sadržajem endotoksina (Enzo Life Sciences, SAD). Koncentraciju endotoksina odredio je proizvođač testom lizata limulusovih amebocita (LAL) te je iznosila 2,7 EU/mg pročišćenog proteina. Stoga je kao negativna kontrola u svim pokusima korištena ekvivalentna količina LPS-a.

Stanice su tretirane LPS-om kao pozitivnom kontrolom za aktivaciju TLR4, te LTA-om kao pozitivnom kontrolom za aktivaciju TLR2. Korišteni LPS izoliran je iz *E.coli* O111:B4 (Sigma–Aldrich, SAD), dok je LTA izolirana iz *S.aureus* (Invivogen, Francuska) te je koncentracija endotoksina u njoj iznosila 10 EU/mg.

3.3.2. Tretiranje stanica ekstraktom dima cigareta

Ekstrakt dima cigareta (CSE, engl. cigarette smoke extract) korišten u istraživanju pripreman je svježi prije svakog provedenog pokusa i to na način da je dim dvije cigarete marke 3R4F Kentucky Research Cigarettes (University of Kentucky) kojima su odstranjeni filtri propuhan kroz 25 mL odgovarajućeg medija bez seruma pomoću peristaltičke pumpe (Miniplus Evolution, Gilson, SAD). Pripremljeni ekstrakt dima cigarete smatran je kao 100 %-tni. Za pokuse 100 % CSE se razrijeđivao s TIPSA medijem bez seruma kako bi dobile potrebne koncentracije za tretman stanica (van der Toorn i sur., 2007).

Za svaki pripremljeni CSE (neposredno prije provođenja svakog pokusa) provjereno je odgovara li njegova apsorbancija na 320 nm standardiziranim vrijednostima.

Standardizacija dima cigareta: dobiveni 100 %-tni CSE razrijedio se na koncentracija 2,5 %, 5%, 10%, 15% i 20%. Nakon toga izmjerila mu se apsorbancija na 320 nm prema odgovarajućem mediju bez seruma kao slijepoj probi. Za mjerenje apsorbancije korišten je spektrofotometar (CECIL Aquarius CE 7200). Pokus se ponovio 6 puta u 3 uzastopna dana.

3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti laktat dehidrogenaze u mediju iznad stanica

Da bi se ispitala citotoksičnost određene tvari ili integritet stanične membrane određuje se katalitička aktivnost LDH. LDH se nalazi isključivo u citoplazmi te ga ne bi smjelo biti u mediju ukoliko je očuvan integritet stanične membrane.

Princip određivanja katalitičke aktivnosti temelji se na oksidaciji L-laktata u piruvat uz LDH pri čemu se NAD^+ reducira te se kontinuirano mjeri porast apsorbancije NADH na 340 nm pri 37 °C prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi.
20 μL medija iznad tretiranih stanica inkubira se 2 minute na 37 °C, nakon čega slijedi analiza na poluautomatskom analizatoru Trace 30 uz upotrebu reagensa za određivanje LDH (500 μL) (Dijagnostika d.o.o., Hrvatska ili Greiner Diagnostic GmbH, Njemačka).
Kao 100 % uzima se srednja vrijednost katalitičkih aktivnosti LDH netretiranih stanica, a vrijednosti katalitičkih aktivnosti LDH tretiranih stanica izražavaju se kao udio (%) u odnosu na netretirane stanice. Rezultati se prikazuju kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

3.5. Detekcija proteina Western blot metodom

3.5.1. Priprema staničnih lizata za Western blot analize

Stanice su podvrgnute tretiranju s različitim koncentracijama rhHsp70, LPS-a, LTA i CSE-a ili njihovim kombinacijama tijekom 24 h. Sva tretiranja na 16-HBE stanicama vrše se u EMEM-u bez FBS-a.

Nakon 24 satnog tretiranja, ploča s 24 jažice na kojima su nasađene stanice stavlja se na led, a medij iznad stanica uklanja se s vakuum sisaljkom. Adherirane stanice ispiru se 2 puta s ledeno hladnim PBS-om. U svaku jažicu dodaje se po 100 μL ledeno hladnog pufera za liziranje stanica (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 % glicerol,

1 mM natrij-ortovanadat uz dodatak proteaznih inhibitora (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)) te se ostavi stajati na ledu 20 minuta. Stanice se zatim odvoje od podloge laganim struganjem silikonskim strugačem, a sadržaj svake jažice prenese se u epruvetu od 1,5 mL i centrifugira na 15000 g dvadeset minuta na +4 °C. Nakon centrifugiranja dio nadsloja se odvoji i pohrani na -20 °C . Taj dio koristi se za određivanje koncentracije proteina, a u preostali dio nadsloja dodaje se šest 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-merkaptoetanol u destiliranoj vodi). Uzorci se potom prokuhaju 3 minute na 97 °C, nakon čega se odmah stave na led i pohrane na -20 °C.

3.5.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu

Za određivanje koncentracije proteina u staničnim lizatima korištena je bicinkoična kiselina (BCA). Ta metoda temelji se na stvaranju kompleksa proteina i Cu^{2+} u alkalnim uvjetima gdje dolazi do redukcija Cu^{2+} u Cu^{+}. BCA s Cu^{+} u alkalnom stvara plavo-ljubičasti kompleks čija se apsorbancija mjeri na 570 nm.

Na ploču koja ima 96 jažica dodaje se 25 µL uzorka razrijeđenih s fiziološkom otopinom te 100 µL radnog reagensa. Radni reagens sadrži 50 volumena BCA i 1 volumen bakar (II) sulfata. Nakon 30 minuta inkubacije pri temperaturi od 37 °C izmjeri se apsorbancija na 570 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (VICTOR3 Multilabel Reader, Perkin Elmer, SAD). Koncentracija proteina očitava se iz standardne krivulje standarda proteina BSA (od engl. Bovine serum albumin).

3.5.3. Dentaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Proteini iz staničnih lizata razdvoje se okomitom diskontinuiranom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE, engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

U elektroforezi je korišten 4 %-tni sabijajući te 10 %-tni razdvajajući gel. Sabijajući gel sastoji se od 6,1 mL ultračiste vode, 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 %-tni razdvajajući gel korišteno je 4,35 mL ultračiste vode, 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.
Uzorci se nanose na gel u volumenima koji odgovaraju 40 μg proteina. Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,25 M glicin, 0,1 % otopina SDS-a). Napon za provođenje elektroforeze je 100 V, a vrijeme trajanja 1,5 h. Da bi se približno odredila molekulska masa proteina korišten je standard proteina koji na gelu daje 8 obojenih proteinskih vrpci u rasponu molekulskih masa od 6 do 200 kDa (Santa Cruz Biotechnology, SAD).

3.5.4. Western blot analiza

Nakon što su odvojeni SDS-PAG elektroforezom, proteini se prenesu na nitroceluloznu membranu. Nitrocelulozna membrana na koju su preneseni proteini ima veličinu pora 0,2 μm (GE Healthcare, SAD). Prijenos proteina se izvršio u uređaju za elektro-prijenos proteina (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, SAD) pri struji jakosti 250 mA kroz 1,5 h.

Da se na slobodna mjesta na membrani ne bi vezala protutijela, membrana je inkubirana u puferu za blokiranje (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. Nakon ispiranja membrane (3x /5 minuta) slijedi inkubacija membrane tijekom noći s primarnim protutijelom koje specifično veže ciljni protein. Nakon ispiranja primarnih protutijela (3x /5 min), membrana se inkubira tijekom 1 sata sa sekundarnim protutijelom. Sekundarna protutijela vežu se na primarna tako što prepoznaju epitop na primarnom protutijelu. Sekundarna protutijela na sebi imaju vezan enzim peroksidazu iz hrena koji u prisustvu kemiluminiscentnog supstrata emitira svjetlo na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela na membrani. Izlaganjem membrane svijetlu na uređaju za fotografiranje ta mjesta se vide kao tamne vrpce.

Poslije provedene inkubacije sekundarnim protutijelom membrana se ponovno ispire puferom za ispiranje (3 puta po 5 minuta). Vizualizacija proteina postiže se inkubacijom membrane u mraku s reagensom za kemiluminiscenciju pripravljenim u laboratoriju (5 mg luminola (Sigma-Aldrich), 1 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 14 mL ultračiste vode, 5 μL H_2O_2, 150 μL pojačivača koji se pripremi otapanjem 11 mg p-kumarinske kiseline (Sigma-Aldrich) u 10 mL

DMSO-a). Inkubacija za vizualizaciju se provodi 1 minutu nakon čega se membrana fotografira u Amersham AI600 Imager-u (GE Healthcare, SAD).

Kako bi se provjerilo jesu li uzorci naneseni na gel sadržavali jednaku koncentraciju proteina te je li se postigla ujednačenost prijenosa proteina na membranu, gelovi su obojani 0,1 % otopinom boje Coomassie briljant plavo R-250 u smjesi 40 % metanola i 10 % octene kiseline. Otopina za odbojavanje (40 % metanola i 10 % octene kiseline u destiliranoj vodi) korištena je za uklanjanje viška boje. Vizualno se očitala ujednačenost proteina u različitim uzorcima. Uz to, provjerena je postignutost ujednačenosti prijenosa na membranu na način da je kao kontrola korištena ravnomjerna ekspresija proteina aktina.

Korištena primarna protutijela:

- za detekciju NLRP3 korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram ostataka koji okružuju Pro92 ljudskog NLRP3 proteina (NLRP3 (D2P5E) Rabbit mAb, #13158; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu);
- za detekciju gasdermina D korištena su kunićja poliklonska protutijela razvijena naspram N-terminalnog ostatka ljudskog gasdermina D (Gasdermin D Antibody, #96458; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju ukupnog proteina MLKL korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram C-terminalnog ostatka ljudskog MLKL-a (MLKL (D2I6N) Rabbit mAb, #14993; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % goveđeg serumskog albumina (BSA));
- za detekciju fosforiliranog MLKL-a korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram fosforiliranog područja aktivnog oblika ljudskog MLKL-a (Ser358), a mogu se vezati i na dvojno-fosforilirano područje aktivnog oblika MLKL-a (Thr357 i Ser358) (Phospho-MLKL (Ser358) (D6H3V) Rabbit mAb, #91689; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju ukupnog proteina RIP korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram ostataka koji okružuju Leu190 ljudskog RIP (RIP (D94C12) XP®

Rabbit mAb, #3493; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);

- za detekciju fosforiliranog RIP korištena su kunićja monoklonska protutijela razvijena naspram fosforiliranog područja aktivnog oblika ljudskog RIP (Ser166) (Phospho-RIP (Ser166) (D1L3S) Rabbit mAb, #65746; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % BSA);
- za detekciju aktina korištena su mišja monoklonska protutijela razvijena naspram N-terminalnog ostatka ljudskog ß-aktina (ß-Actin (8H10D10) Mouse mAb: #3700; Cell Signaling Technology) (razrjeđenje 1:1000 u puferu za ispiranje uz dodatak 5 % obranog mlijeka u prahu).

Korištena sekundarna protutijela:

- za detekciju kunićjih protutijela (pri analizi ekspresije NLRP3, MLKL, pMLKL, RIPK1, pRIPK1) korištena su IgG protutijela iz seruma koze 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 aktina) 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).

3.6. Detekcija mRNA metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. quantitative PCR, qPCR)

3.6.1. Izolacija RNA iz stanica

Za izolaciju RNA stanice su tretirane na isti način kao i za određivanje LDH te je nakon uklanjanja medija iznad stanica, koji se koristi za određivanje LDH, na stanice prilijepljene na ploču dodan TriReagent (Applies Biosystems, SAD) u volumenu 250 µL po jažici. Nakon što je prošlo 5 minuta, uzorci iz jažice preneseni su u epruvete od 1,5 mL i pohranjeni na -20 °C do nastavka procesa izolacije.

Na 1 mL TriReagenta dodaje se 200 µL kloroforma, epruvete se protresu 15-ak sekundi te ostave stajati na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon 10 minuta epruvete se centrifugiraju 15 minuta na 12000 g pri +4 °C. Tekući sloj se odlije, a na talog RNA se doda 1 mL 75 % etanola po 1 mL TriReagenta te se epruveta vorteksira. Uzorci se centrifugiraju 5 minuta na 7500 g i pri temperaturi +4 °C,etanol se odlije, a talog koji sadži RNA ostavi se sušiti na zraku 10-ak minuta. RNA se otopi u vodi bez RNAze te joj se izmjeri apsorbancija na 260 nm i 280 nm (Nanodrop 8000 Spectrophotometer, Termo Scientific) kako bi joj se odredila koncentracija i čistoća.

3.6.2. Sinteza cDNA

Sinteza cDNA vrši se iz RNA pomoću RevertAid First Strand cDNA Synthesis test paketa (Thermo Fisher Scientific, SAD).
RNA se razrijedi vodom bez RNAza na način da u reakcijskoj smjesi bude 1000 ng RNA. Za svaku reakciju dodaje se 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 te se zatim reakcijska smjesa dobro vorteksira.
Uvijeti sinteze cDNA: 5 minuta na 25 °C, 60 minuta pri 42 °C, 5 minuta na 70 °C. Reakcije se provode u uređaju za PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, SAD).

3.6.3. Određivanje ekspresije gena

Nakon što se RNA prevede u cDNA, ona se koristi kao uzorak u qPCR-u. Za provođenje qPCR-a koristi se TaqMan sonda. TaqMan sonda je oligonukleotid koji je na svojem 5'-kraju obilježen fluorescentnom bojom, reporterom (FAM), a na 3'-kraju prigušivačem (engl. quencher). Količina PCR produkta mjeri se na principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET, engl. fluorescence energy resonance transfer) i 5'egzonukleazne aktivnosti DNA polimeraze. TaqMan sonda se zajedno sa početnicom vežu na cDNA. Prije produljenja početnica nema fluorescencije jer su blizu fluorescentna boja i prigušivač. Kako se početnica produljuje, DNA polimeraza razgrađuje TaqMan sondu jer ima 5'-egzonukleaznu aktivnost. Sada fluoresentna boja može fluorescirati jer više nema prigušivača u blizini.
Intenzitet te fluorescencije je proporcionalan koncentraciji nastalog PCR produkta.
Za qPCR korišten je uređaj 7500 Real Time PCR System, uz korištenje TaqMan Universal MasterMix-a te TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, SAD):

- Hs01555410_m1 za IL-1β
- Hs00918082_m1 za NLRP3
- Hs00354836_m1 za kaspazu-1
- Hs99999907_m1 za β2-mikroglobulin (B2M)
- Hs99999904_m1 za peptidil-prolil-izomerazu A (PPIA)

Na ploču s 96 jažica za qPCR dodaje se 5 µL MasterMix-a, 0,5 µL početnice s TaqMan sondom, 0,5 µL cDNA i 4 µL vode po jažici. Ploča se centrifuga 30 sekundi na 500 g. PCR: zagrijavanje na 50 °C tijekom 2 minute, zagrijavanje na 95 °C tijekom 10 minuta zatim se provodi 40 ciklusa koji se sastoje od zagrijavanja na 95 °C 15 sekundi i na 60 °C 1 minutu u kojima se i vrši mjerenje fluorescencije.

Ekspresija gena određivana je za IL - 1β, NLRP3 i kaspazu-1,te dva referentna gena b2m i ppia, tj. to su geni čija se ekspresija ne mijenja pod utjecajem različitih faktora. Ekspresija određivanih gena izražava se prema ekspresiji referentnih gena.

Relativna ekspresija gena čiju ekspresiju želimo odrediti (CILJ) računa 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 ± standardna pogreška (SEM). Statističke analize koje su korištene za testiranje razlike između skupina podataka su t-test ili jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, engl. One-way analysis of variance). *Post-hoc* analize provedene su Sidakovom metodom. P vrijednost manja od 0,05 ($P<0,05$) smatra se statistički značajnom. Podaci su analizirani upotrebom programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., SAD).

4. REZULTATI

Stanice 16-HBE tretirane su tijekom 24 sata s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 2,5 i 15 % CSE-om, 0,1 μg/mL LPS-om i s 1 μg/mL LTA te njihovim kombinacijama. Kako bi se ispitala aktivacija NLRP3 inflamasoma te upalni odgovor, odredila se ekspresija mRNA za NLRP3, IL-1β i kaspazu-1 qPCR-om. Određivanjem aktivnosti LDH izlučene u medij iznad stanica ispitana je varijabilnost stanica. Način umiranja stanica ispitan je mjerenjem ekspresije kaspaze-1 i IL-1β (piroptoza). Nadalje određena je i ekspresija gasdermina D (piroptoza) kao i aktivacija i ekspresija RIPK1 i MLKL -a (nekroptoza) Western blot analizom.

4.1. Ispitivanje mehanizma djelovanja LPS – a, LTA, rhHsp70, CSE -a te njihovih kombinacija na 16 HBE stanice

4.1.1. Ispitivanje aktivacije NLRP3

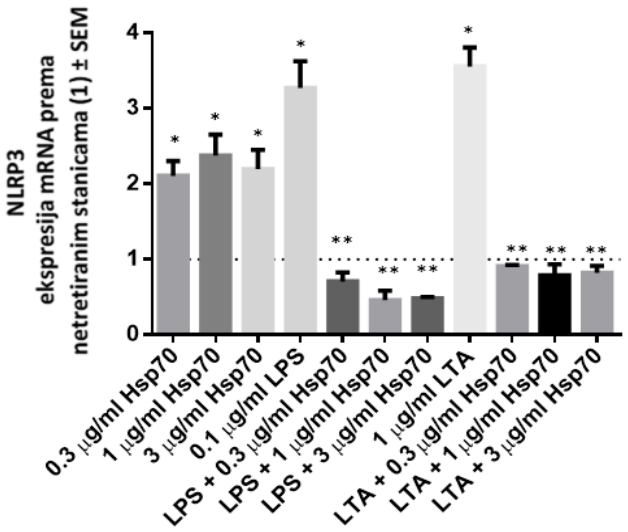
4.1.1.1. Ekspresija mRNA za NLRP3

Nakon 24-satnog tretiranja 16-HBE stanica s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/mL rezultati mjerenja ekspresije mRNA za NLRP3 pokazali su statistički značajnu promjenu u odnosu na netretirane stanice (redom prema koncentracijama; P=0,0007, P<0,0001, P=0,0003). Statistički značajne promjene u odnosu na netretirane stanice uočene su i nakon izlaganja stanica 2,5 % -tnom CSE-u (P<0,0001) te 15 %-tnom CSE-u (P = 0,0074).
Također, LPS u koncentraciji 0,1 μg/mL inducira statistički značajnu promjenu u odnosu na netretirane stanice (P<0,0001), kao i LTA u koncentraciji 1 μg/mL (P<0,0001). Sve ovo upućuje da je nakon tretiranja ovim agensima došlo do povećane ekspresije mRNA za NLRP3 u 16-HBE stanicama.

Analizom je utvrđeno da tretiranjem stanica tijekom 24 sata kombinacijama 0,1 μg/mL LPS-a s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70 nije došlo do statistički značajne promjene u odnosu na netretirane stanice (P=0,7592, P=0,0881 i P=0,2867). Međutim u tim istim kombinacijama uočena je statistički značajna promjena u odnosu na stanice tretirane samo LPS-om (P=0,0007, P<0,0001 i P=0,0004) pri čemu je došlo do smanjene ekspresije mRNA.

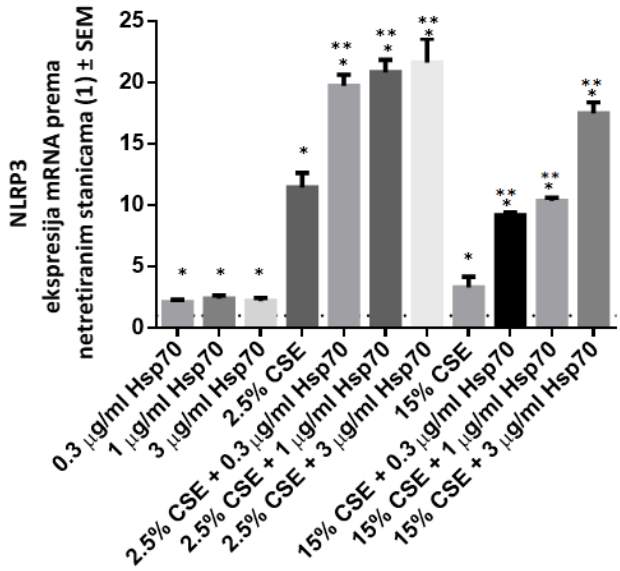
Što se tiče LTA i kombinacija s već spomenutim koncentracijama rhHsp70, također nije došlo do statistički značajne promjene u odnosu na netretirane stanice (P=0,9861, P=0,6243 i P=0,8823). S druge strane uočena je statistički značajna promjena u odnosu na stanice

tretirane samo s LTA (P< 0,0001 za sve kombinacije) pri čemu je došlo do sniženja ekspresije mRNA u 16-HBE stanicama (Slika 1).



Slika 1. Grafički prikaz ekspresije mRNA za NLRP3 u 16-HBE stanicama nakon 24-satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 0,1 μg/mL LPS-om i 1 μg/mL LTA te njihovim kombinacijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.
Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.
* statistički značajno (P<0,05) u odnosu na netretirane stanice
** statistički značajno (P<0,05) u odnosu na stanice tretirane LPS-om ili s LTA

Tretiranje stanica s 2,5 %, 15 % CSE, 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70 rezultiralo je značajnim porastom ekspresije NLRP3 (P<0,0001, P=0,0074) u odnosu na netretirane stanice. Kombinacija 2,5 % CSE i rhHsp70 također je rezultirala sa statistički značajnom promjenom u odnosu na netretirane stanice (P<0,0001 za sve kombinacije). Statistički značajne promjene uočene su i prema stanicama tretiranim samo 2,5 %-tnim CSE – om (P=0,0028, P=0,0010 i P=0,0005). Također, u kombinacijama 15 % CSE i rhHsp70 došlo je do statistički značajnih promjena u odnosu na netretirane stanice (P<0,0001 za sve kombinacije) te promjena u odnosu na stanice tretirane samo CSE-om (P=0,0001, P<0,0001 i P<0,0001). Ovi podaci ukazuju da je nakon tretiranja svim ovim kombinacijama došlo do povećane ekspresije mRNA za NLRP3 u 16-HBE stanicama (Slika 2).



Slika 2. Grafički prikaz ekspresije mRNA za NLRP3 u 16 -HBE stanicama nakon 24-satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 2,5 % i 15 % CSE-om te njihovim kombinacijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.

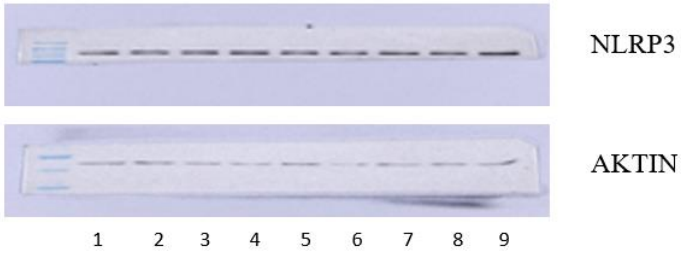
* statistički značajno (P<0,05) u odnosu na netretirane stanice

** statistički značajno (P<0,05) u odnosu na stanice tretirane CSE - om

4.1.1.2. Ekspresija NLRP3 proteina

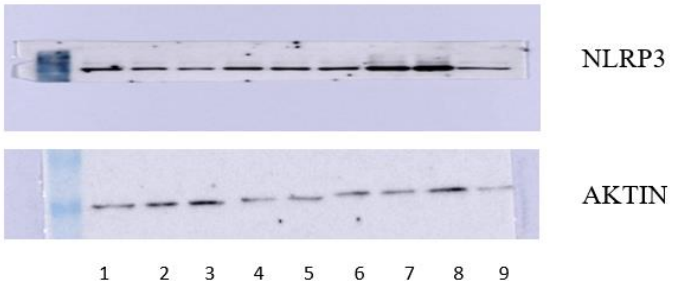
Provedena je Western blot analiza kako bi se ispitala ekspresija NLRP3 proteina u 16-HBE stanicama nakon tretiranja s rhHsp70 (0,3, 1 i 3 μg/mL), LPS-om (0,1 μg/mL), LTA-om (1 μg/mL) i CSE-om (2,5 i 15 %-tnim) te njihovim kombinacijama. Aktin, odnosno njegova ravnomjerna ekspresija, pokazatelj je ujednačenosti prijenosa proteina NLRP3 na membranu.

Nakon tretiranja stanica rhHsp70, LPS-om i LTA-om te njihovim kombinacijama nije uočena povećana ekspresija NLRP3 u odnosu na netretirane stanice (Slika 3).



Slika 3. Western blot analiza ekspresije NLRP3 u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70, LPS-om i LTA-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata.
1 - netretirane stanice, **2** - 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** -1 μg/mL rhHsp70, **4** - LPS, **5** - LPS + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** -LPS + 1 μg/mL rhHsp70, **7** - LTA, **8** - LTA + 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** - LTA + 1 μg/mL rhHsp70

Nakon tretiranja stanica CSE-om i rhHsp70 te njihovim kombinacijama uočena je povećana ekspresija proteina NLRP3 za 15 % CSE i za kombinaciju 15 %-og CSE s 0,3 μg/mL rhHsp70 u odnosu na natretirane stanice (Slika 4).

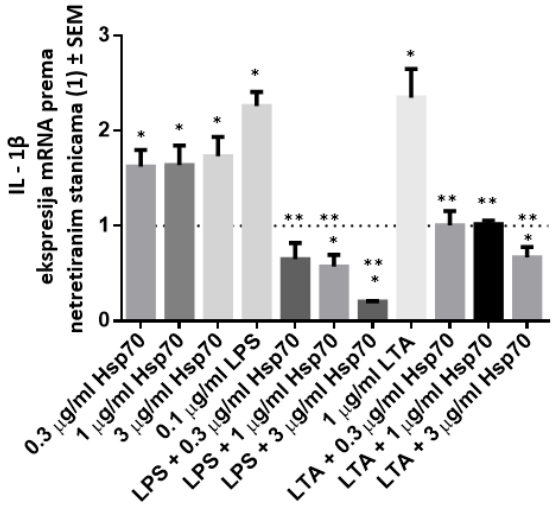


Slika 4. Western blot analiza ekspresije NLRP3 u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70 i CSE-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata.
1 - netretirane stanice, **2** - 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** - 1 μg/mL rhHsp70, **4** -2,5 % CSE , **5** - 2,5 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** - 2,5 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70, **7** -15 % CSE, **8** - 15 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** -15 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70

Western blot analizom u lizatima 16-HBE stanica nakon 24-satnog izlaganja rhHsp70 proteinu, u koncentraciji 3 μg/mL nije uočena ekspresija NLRP3 proteina te stoga podaci nisu prikazani. Isto vrijedi i za kombinacije rhHsp70 u toj koncentraciji s LPS-om, LTA-om i CSE-om.

4.1.2. Ispitivanje ekspresije mRNA za IL-1β

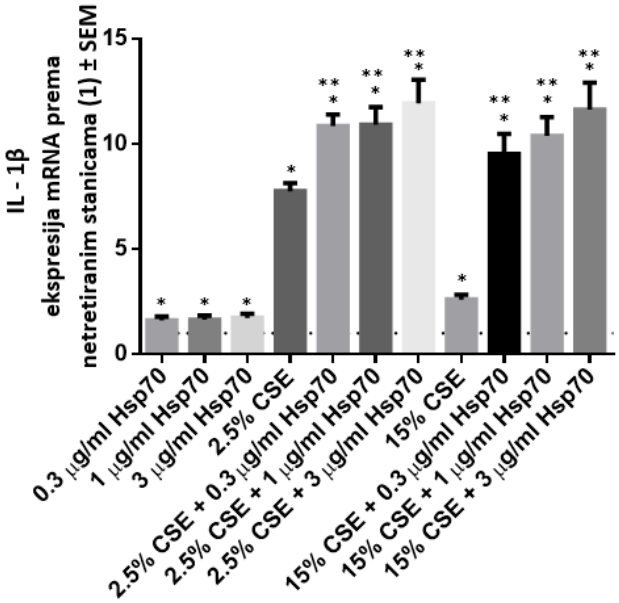
16-HBE stanice tretirane su s rhHsp70 (0,3, 1, 3 μg/mL), LTA (1 μg / mL) i LPS-om (0,1 μg/mL). Svi tretmani rezultirali su povećanjem ekspresije IL-1β u odnosu na netretirane stanice (P=0,0089, P=0,0071, P=0,0153 (za rhHsp70) i P<0,0001 (za LTA i LPS)). Što se kombinacija rhHsp70 s LPS i LTA tiče, do statistički značajne promjene u odnosu na netretirane stanice došlo je samo u dvije kombinacije: LPS + 1 μg/mL rhHsp70 i LPS + 3 μg/ mL rhHsp70 (P=0,0268 i P=0,0131). Međutim, sve kombinacije LPS, LTA s rhHSP70 rezultirale su značajnim smanjenjem ekspresije IL-1β u odnosu na stanice tretirane samo s LPS-om ili s LTA (Slika 5).



Slika 5. Grafički prikaz ekspresije mRNA za IL – 1β u 16 – HBE stanicama nakon 24 – satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 0,1 μg/mL LPS -om i 1 μg/mL LTA te njihovim kombinacijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.
Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.
* statistički značajno (P<0,05) u odnosu na netretirane stanice
** statistički značajno (P<0,05) u odnosu na stanice tretirane LPS-om ili s LTA

Nakon tretiranja 16-HBE stanica 24 sata s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg /mL izmjerena je ekspresija mRNA za IL-1β. Došlo je do statistički značajne promjene u odnosu na netretirane stanice (P=0,0089, P=0,0071 i P=0,0153). Nadalje, stanice su tretirane i s CSE-om (2,5 i 15 %-tnim). Te je došlo do statistički značajne razlike u odnosu na netretirane

stanice (P<0,0001 za obje koncentracije CSE-a). Zatim je slijedilo tretiranje stanica s CSE-om (2,5 %) u kombinaciji s nizom koncentracije rhHsp70 (0,3, 1 i 3 μg/mL) te kombinacijom CSE-a (15 %) i rhHsp70 u već navedenim koncentracijama. Sve kombinacije su dovele do statistički značajne promjene u odnosu na netretirane stanice (P<0,0001 za sve kombinacije) kao i do promjene u odnosu na stanice tretirane samo CSE-om. U svim je kombinacijama došlo do povećanja ekspresije mRNA za IL-1β (Slika 6).



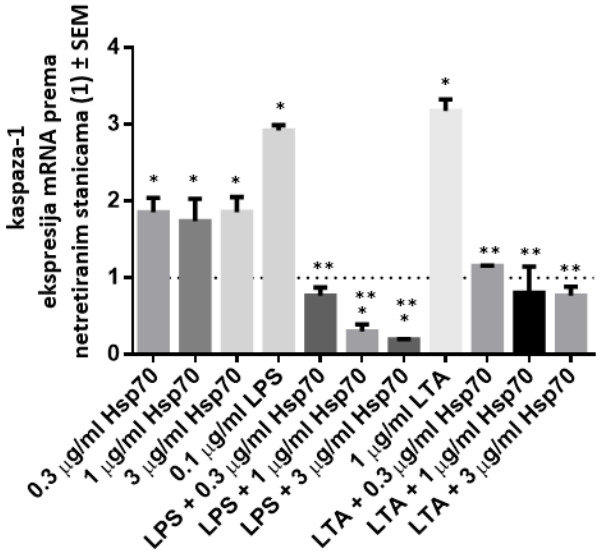
Slika 6. Grafički prikaz ekspresije mRNA za IL-1β u 16-HBE stanicama nakon 24-satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 2,5 % i 15 % CSE-om te njihovim kombinacijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.
Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.
* statistički značajno (P<0,05) u odnosu na netretirane stanice
** statistički značajno (P<0,05) u odnosu na stanice tretirane CSE - om

4.1.3. Ispitivanje ekspresije mRNA za kaspazu-1

Da bi se ispitala ekspresija mRNA za kaspazu-1, stanice 16-HBE bile su tijekom 24 sata tretirane s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/mL. Kod sve tri koncentracije uočena je povećana ekspresija gena tj. došlo je do statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice (P= 0,0043, P=0,0134 i P=0,0042). Stanice su bile tretirane i s LTA (1 μg/mL) i LPS-om (0,1 μg/mL). Također je došlo do statistički značajnog porasta u ekspresiji u odnosu na netretirane stanice (P<0,0001 i za LPS i LTA).

Za kombinacije LTA s rhHsp70, kao i LPS s rhHsp70 uočena je statistički značajno smanjenje ekspresije za kombinacije LPS + 1 μg/mL rhHsp70 te LPS + 3 μg/mL rhHsp70 (P< 0,0001 za obje kombinacije) u odnosu na netretirane stanice. Sve kombinacija LPS i rhHsp70 rezultirale su smanjenjem ekspresije u odnosu na stanice tretirane samo LPS-om (P< 0,0001 za sve kombinacije).

Kombinacije LTA s rhHsp70 nisu dovele do statistički značajnih promjena u odnosu na netretirane stanice, međutim ukoliko se gleda promjena u odnosu na stanice tretirane samo s LTA došlo je do značajnog smanjenja ekspresije za sve 3 kombinacije: (P=0,0028, P=0,0003, P=0,0009) (Slika 7).



Slika 7. Grafički prikaz ekspresije mRNA za kaspazu – 1 u 16 – HBE stanicama nakon 24 – satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 0,1 μg/mL LPS -om i 1 μg/mL LTA te njihovim kombinacijama.

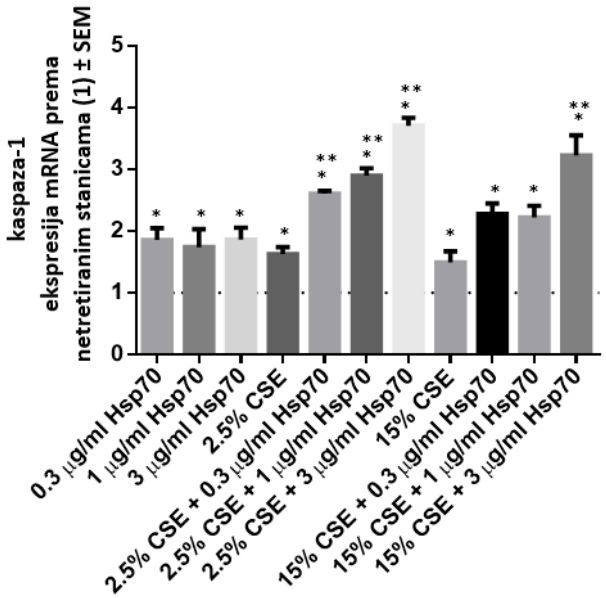
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.

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

** statistički značajno (P<0,05) u odnosu na stanice tretirane LPS-om ili s LTA

Ekspresija mRNA za kaspazu-1 također je povećana za pojedinačne tretmane s rhHsp70 i s 2,5 i 15 % CSE (P=0,0043, P=0,134, P=0,0042 (za rhHsp70) i P=0,0002, P=0,0078 (za CSE)). Kombinacije 2,5% CSE s rhHsp70 i 15% CSE s rhHsp70 također je dovelo do značajnog porasta ekspresije u odnosu na netretirane stanice (P<0,0001 za sve kombinacije). Kombinacije 2,5% CSE i rhHsp70 rezultirale su također povećanom ekspresijom u odnosu na tretman samo s 2,5 % CSE-om (P <0,0001 za sve kombinacije). Statistički značajnu razliku u odnosu na stanice tretirane samo samo s 15 % - tnim CSE-om pokazala je jedino kombinacija CSE s 3 μg/mL rhHsp70 (P=0,0004) (Slika 8).



Slika 8. Grafički prikaz ekspresije mRNA za kaspazu-1 u 16-HBE stanicama nakon 24-satnog tretiranja s 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 2,5 % i 15 % CSE-om te njihovim kombinacijama.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

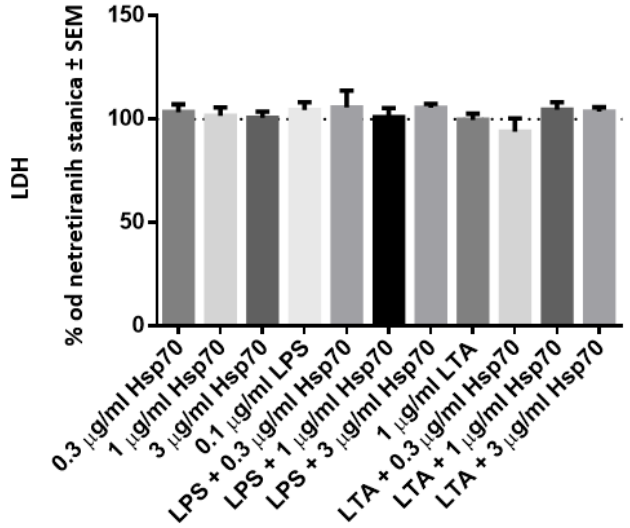
Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.

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

** statistički značajno (P<0,05) u odnosu na stanice tretirane CSE-om

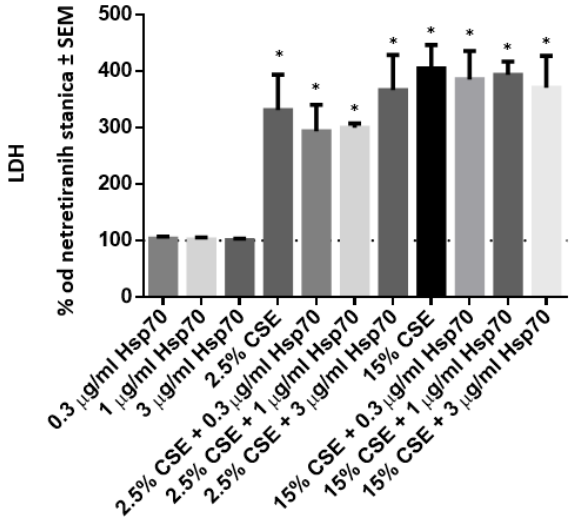
4.1.4. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH

Katalitička aktivnost LDH otpuštene u medij iznad 16-HBE stanica određivana je nakon 24-satnog tretiranja s rhHsp70 u koncentracijama 0,3, 1 i 3 μg/mL. Također, stanice su tretirane i s LTA (1 μg/mL) te LPS-om (0,1 μg/mL) te njihovim kombinacijama s rhHsp70. Niti u jednom slučaju nije uočena statistički značajna promjena (Slika 9).



Slika 9. Grafički prikaz utjecaja 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 0,1 μg/mL LPS i 1 μg/mL LTA i njihovih kombinacija na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad 16-HBE stanica.
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.
Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.

Uz rhHsp70 i LPS te LTA, stanice su 24 sata bile tretirane i 2,5 i 15 % tnim CSE-om, te kombinacijama CSE-a i rhHsp70. Što se samog CSE-a tiče, statistički značajna razlika u odnosu na netretirane stanice uočena je u obje koncentracije ($P=0,0009$ za 2,5 %-tni CSE i $P<0,0001$ za 15 % -tni CSE) tj. uočena je povećana katalitička aktivnost LDH.
Nakon tretiranja stanicama s kombinacijama CSE-a i rhHsp70 također je uočen statistički značajan porast LDH aktivnosti u odnosu na netretirane stanice ($P=0,0057$, $P=0,0138$, $P=0,0002$, $P<0,0001$,$P<0,0001$,$P<0,0001$) (Slika 10).
Na ovaj su način ispitani citotoksični učinci agenasa kojima su stanice bile tretirane tijekom 24 sata te aktivacija piroptoze ili nekroptoze.



Slika 10. Grafički prikaz utjecaja 0,3, 1 i 3 μg/mL rhHsp70, 2,5 % CSE, 15 % CSE i njihovih kombinacija na katalitičku aktivnost LDH u mediju iznad 16-HBE stanica.

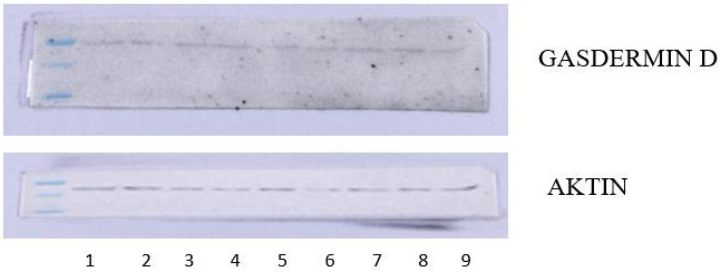
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Isprekidana linija predstavlja izmjerenu vrijednost za netretirane stanice.

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

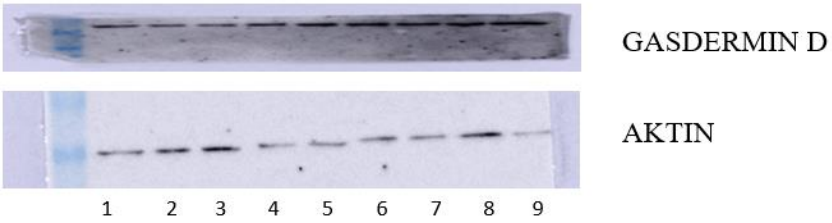
4.1.5. Ispitivanje ekspresije proteina gasdermina D

Western blot analizom lizata 16-HBE stanica nije dokazana razlika u ekspresiji proteina gasdermina D nakon tretiranja stanica tijekom 24 sata rhHsp70, LPS-om i LTA-om te njihovim kombinacijama (Slika 11).



Slika 11. Western blot analiza ekspresije gasdermina u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70, LPS-om, LTA-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata.
1 - netretirane stanice, **2** – 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** – 1 μg/mL rhHsp70, **4** – LPS , **5** – LPS + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** – LPS + 1 μg/mL rhHsp70, **7** – LTA, **8** –LTA+ 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** – LTA + 1 μg/mL rhHsp70

U stanicama tretiranim CSE-om te kombinacijama CSE-a i rhHsp70 dokazana je veća ekspresija gasdermina u odnosu na netretirane stanice (Slika 12).

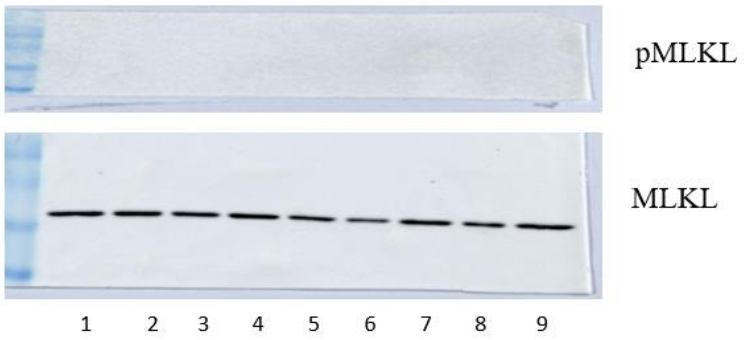


Slika 12. Western blot analiza ekspresije gasdermina u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70 i CSE-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata.
1 - netretirane stanice, **2** – 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** – 1 μg/mL rhHsp70, **4** – 2,5 % CSE , **5** – 2,5 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** – 2,5 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70, **7** – 15 % CSE, **8** – 15 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** – 15 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70

4.1.6. Ispitivanje aktivnosti MLKL

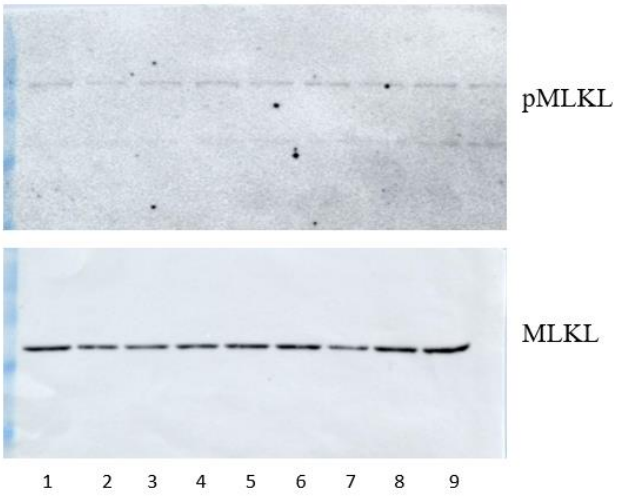
Da bi se ispitala aktivacija MLKL učinjena je Western blot analiza kojom je ispitana ekspresija ukupne MLKL te njenog aktivnog, p-MLKL oblika. Analiza je rađena na lizatima 16-HBE stanica koje su prije toga 24 sata bile izložene rHsp70, LPS-u, LTA-u i CSE-u te njihovim kombinacijama.

Ekspresijea ukupnog MLKL nije se razlikovala u stanicama tretiranim s rhHsp70, LPS-om, LTA-om, CSE-om te kombinacijama istih u odnosu na netretirane stanice (Slika 13 i14). rhHsp u kombinaciji s LPS i LTA nije doveo aktivacije MLKL. Međutim, za razliku od LPS-a i LTA, CSE sam ili u kombinaciji s rhHsp70 potiče aktivaciju MLKL. Naime, uočena je ekspresija pMLKL, aktivnog oblika MLKL, nakon tretiranja stanica CSE-om ili kombinacijama CSE-a i rhHsp70.



Slika 13. Western blot analiza ekspresije ukupne MLKL i aktivirane p-MLKL u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70, LPS-om, LTA-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata.

1 - netretirane stanice, **2** – 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** – 1 μg/mL rhHsp70, **4** – LPS , **5** – LPS + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** – LPS + 1 μg/mL rhHsp70, **7** – LTA, **8** –LTA+ 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** – LTA + 1 μg/mL rhHsp70

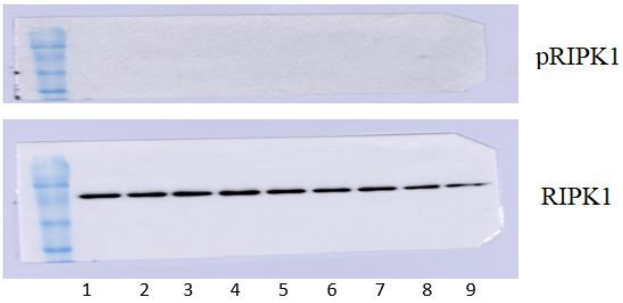


Slika 14. Western blot analiza ekspresije ukupne MLKL i aktivirane p-MLKL u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70 i CSE-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata.
1 - netretirane stanice, **2** – 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** – 1 μg/mL rhHsp70, **4** – 2,5 % CSE ,
5 – 2,5 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** – 2,5 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70, **7** – 15 % CSE,
8 – 15 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** – 15 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70

4.1.7. Ispitivanje aktivnosti RIPK1

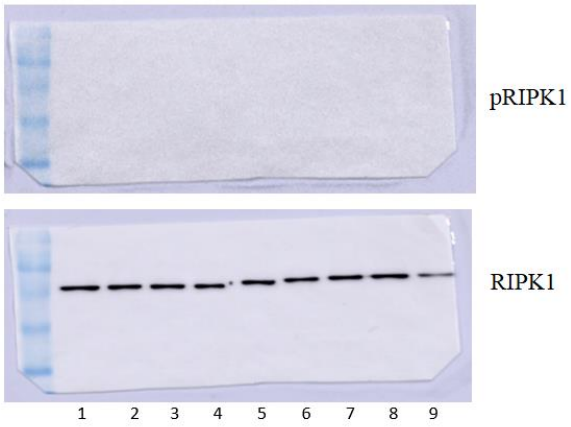
Western blot analiza provedena je na lizatima 16-HBE stanica nakon njihovog 24-satnog tretiranja s rhHsp70, LPS-om, LTA-om i CSE-om te njihovim kombinacijama. Analiza je provedena da bi se utvrdila ekspresija ukupne RIPK1 i aktivirane p-RIPK1.

Analiza provedena na stanicama nakon tretiranja istih s rhHsp70, LPS-om, LTA-om, CSE-om i njihovim kombinacijama nije dokazala razliku u ekspresiji ukupne RIPK1, kao ni aktivaciju RIPK1 (Slika 15 i 16).



Slika 15. Western blot analiza ekspresije ukupnog RIPK1 i aktiviranog p-RIPK1 u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70, LPS-om, LTA-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata.

1 - netretirane stanice, **2** – 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** – 1 μg/mL rhHsp70, **4** – LPS , **5** – LPS + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** – LPS + 1 μg/mL rhHsp70, **7** – LTA, **8** –LTA+ 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** – LTA + 1 μg/mL rhHsp70



Slika 16. Western blot analiza ekspresije ukupnog RIPK1 i aktiviranog p-RIPK1 u lizatima 16-HBE stanica tretiranih s rhHsp70 i CSE-om te njihovim kombinacijama tijekom 24 sata. **1** - netretirane stanice, **2** – 0,3 μg/mL rhHsp70, **3** – 1 μg/mL rhHsp70, **4** – 2,5 % CSE , **5** – 2,5 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **6** – 2,5 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70, **7** – 15 % CSE, **8** – 15 % CSE + 0,3 μg/mL rhHsp70, **9** – 15 % CSE + 1 μg/mL rhHsp70

5. RASPRAVA

Ovo je istraživanje provedeno na 16-HBE stanicama koje su humana bronhijalna epitelna stanična linija izolirana iz pluća. U istraživanju su stanice bile tretirane s rhHsp70, LPS-om, LTA-om i CSE-om te njihovim različitim kombinacijama kroz 24 sata. Cilj ovog istraživanja bio je saznati dolazi li, i ako dolazi, u kojim koncentracijama navedenih agenasa, do aktivacije nekroptoze i piroptoze, odnosno do aktivacije NLRP3 inflamasoma.

Kako bi se ispitalo djelovanje Hsp70 proteina, koje prema Giulianu i sur. stimulira upalni odgovor u humanim bronhijalnim epitelnim stanicama kao što su i 16-HBE stanice, u ovom je istraživanju korišten rekombinantni humani Hsp70 protein (Giuliano i sur.,2011). Hsp70 djeluje kao DAMP molekula, dok su kao PAMP molekule korišteni LPS i LTA. LPS djeluje preko TLR4, a LTA preko TLR2 receptora.

U pacijenata oboljelih od KOPB-a, posebno u egzacerbacijama, moguće su bakterijske infekcije. Iz tog razloga u ovom su se istraživanju ispitala i kombinirana djelovanja rhHsp70, LPS-a i LTA.
Dong i sur. su uočili da izlaganje 16-HBE stanica CSE-u uzrokuje povećanu ekspresiju Hsp70, a time i povećani upalni odgovor (Dong i sur., 2013). Kako bi se vidjelo kako CSE sam ili u kombinaciji s Hsp70 djeluje na stanice i upalni odgovor kod pacijenata s KOPB-om, u ovom istraživanju provedeno je tretiranje stanica CSE-om i rhHsp70 proteinom te njihovim kombinacijama.

Učinci rhHsp70, LTA, LPS-a i CSE-a te njihovih kombinacija ispitani su određivanje aktivacije RIP i MLKL, određivanjem ekspresije gasdermina D i NLRP3, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH te određivanjem ekspresije mRNA za NLRP3, kaspazu-1 i IL-1β.

Kako bi se ispitalo je li došlo do aktivacije nekroptoze u istraživanju se gledala aktivacija RIPK1 i MLKL. Nakon tretiranja stanica rhHsp70, LPS-om, LTA-om i kombinacijama nije došlo do aktivacije MLKL i RIPK1 iako su ekspresija ukupne MLKL i RIPK1 dokazane nakon tretiranja stanica. S druge strane, tretiranje rhHsp70 i CSE-om i njihovim kombinacijama dovelo je do aktivacije MLKL. Međutim, niti tretiranje s CSE-om nije dovelo do aktivacije RIPK1. Xu i sur. ispitivali su ekspresiju i aktivaciju RIPK1 i MLKL proteina na HBE stanicama. Proveli su Western blot analizu i dokazali ukupne i aktivirane RIPK1 i MLKL (Xu i sur., 2018).

Aktivacija piroptoze ispitana je na način da se ispitala aktivacija kaspaze-1, ekspresija gasderimna D i ekspresija mRNA IL-1β. Rezultati su pokazali ekspresiju gasdermina D u stanicama nakon tretiranja s 2,5 i 5 % CSE-om te njihovim kombinacijama s 0,3 i 1 μg/ml rhHsp70. Što se kaspaze-1 tiče, njena ekspresija povećana je kada je za tretiranje korišten CSE ili rhHSP70 samostalno i u kombinaciji. Postoje istraživanja koja pokazuju povećanu ekspresiju kaspaze-1 u oboljelih od KOPB-a. Posebice je povećana ekspresija kod pacijenata s akutnom egzacerbacijom te pušača (Mortaz i sur., 2011; Wang i sur.,2018). Tretiranje stanica s rHsp70, LPS ili LTA također je rezultiralo povećanjem ekspresije mRNA za kaspazu-1 u odnosu na netretirane stanice. Međutim, u odnosu na stanice tretirane samo s LPS ili LTA, njihove kombinacije s rhHsp70 imale su smanjenu ekspresiju. Aktivna kaspaza-1 glavni je izvršitelj piroptoze u nekanonskom putu te je njen glavni supstrat gasdermin D kojeg ona kida (Bergsbaken i sur.,2009). Iz toga se može zaključiti da je u 16-HBE stanicama korištenim u ispitivanju aktivirana piroptoza nakon tretmana s rhHsp70, CSE, LPS i LTA kao i s kombinacijama CSE i rhHsp70. Ekspresija gasdermina nije uočena u slučaju pojedinačnog tretmana s rhHsp70, LPS i LTA što je moguće posljedica značajno manje osjetljivost Wester blot metode u odnosu na njerenje ekspresije mRNA.

Ispitivanje ekspresije RIPK1, MLKL tj. kaspaze-1, gasdermina-D i IL-1β ukazuje na to koji tip stanične smrti je aktiviran u stanicama. Međutim, da bi se vidjelo radili se o nekrozi ili apoptozi provedeno je ispitivanje katalitičke aktivnosti LDH. LDH je citoplazmatski enzim te ukoliko se nalazi u mediju iznad stanica riječ je o nekrozi koja se dešava, tj. narušen je integritet stanične membrane. Kod apoptoze nema primarne štete na membrani, stoga LDH nije prisutan u mediju.

U ovom istraživanju pokazalo se da tretiranje stanica s rhHsp70, LPS-om, LTA-om i kombinacijama ne dovodi do značajnog povećanja katalitičke aktivnosti LDH. Ona je u tim slučajevima vrlo blago povećana ili čak i nešto smanjena. S druge strane, nakon tretiranja stanica s rhHsp70, CSE-om i kombinacijama, aktivnost LDH je značajno povećana. Iz toga se može zaključiti da postoji mogućnost sinergističkog djelovanja CSE-a s rhHsp70.

Istraživanje koje su proveli Huang i sur. na THP-1 stanicama koje su također stanična linija KOPB-a kao i 16-HBE stanice na kojima je provedeno ovo istraživanje, govori da samo koncentracija LPS-a veće od 10 μg/mL smanjuju vijabilnost stanica (Huang i sur., 2012). Ta

tvrdnja moguće vrijedi i za ovo istraživanje jer je u ovom istraživanju korišten LPS u koncentraciji od samo 0,1 μg/mL.

U istraživanju koje su proveli Fu i sur. otkriveno je da je razina ekspresije NLRP3, kaspaze-1 i IL-1β znatno povišena, posebice kod onih pacijenata s KOPB-om kod kojih su prisutne akutne egzacerbacije (Fu i sur.,2018).
Postoje i istraživanja koja navode da je CSE odgovoran za povećanje ekspresije NLRP3, kaspaze-1 i IL-1β u pacijenata s KOPB-om (Li i sur., 2016; Mortaz i sur. 2011).

U ovom istraživanju utvrđeno je da rhHsp70, LPS i LTA svaki zasebno uzrokuju povećanu ekspresiju NLRP3 u odnosu na netretirane stanice. Zanimljivo je da LPS ili LTA u kombinaciji s rhHsp70 uzrokuju smanjenje ekspresije NLRP3, ali samo u usporedbi sa stanicama tretiranim s LPS ili LTA. Iz toga se može zaključiti da postoji moguće antagonističko djelovanje LPS i LTA s rhHsp70. S druge strane, CSE sam, ali i u kombinacijama s rhHsp70 uzrokuje povećanu ekspresiju NLRP3. Povećanje ekspresije u kombinacijama CSE i rhHsp70 moguće je protumačiti kao sinergističko djelovanje molekula.

Razna istraživanja pokazala su da je kod oboljelih od KOPB-a povećana ekspesija IL-1β, snažnog pro-upalnog citokina koji potiče upalni odgovor nakon oštećenja stanice ili izlaganja štetnim faktorima (Fu i sur., 2018; Pinkerton i sur.,2017; Zou i sur., 2017; Hammad i sur., 2015). U ovom su istraživanju stanice bile tretirane s rhHsp70, LPS-om, LTA-om, CSE-om i njihovim kombinacijama kako bi se vidjelo kako ti agensi utječu na ekspresiju mRNA za IL-1β. Rezultati su pokazali da samostalno svi agensi dovode do povećanja ekspresije IL-1β, dok kombinacije rhHsp70 s LPS-om ili LTA-om dovode do smanjenja ekspresije. Tu također vidimo antagonizam između tih molekula. Sinergistički pak djeluje CSE u kombinaciji s rhHsp70 jer povećava ekspresiju mRNA za IL-1β.

6. ZAKLJUČCI

- Protein rhHsp 70, LPS, LTA i CSE svaki pojedinačno dovode do povećanja ekspresije mRNA za NLRP3, IL-1β i kaspazu-1 što upućuje na aktivaciju NLRP3 inflamasoma i upalu.
- Kombinacija rhHsp 70 s CSE-om također dovodi do povećanja ekspresije mRNA za NLRP3, IL-1β i kaspazu-1.
- LPS i LTA, svaki u kombinaciji s rhHsp70 uzrokuju smanjenje ekspresije mRNA za NLRP3, IL-1β i kaspazu-1 što ukazuje na potiskivanje upalnog procesa.
- LPS, LTA i rhHsp70 samostalno ili u kombinacijama nisu znatno utjecali na aktivnost LDH, što znači da nakon tretiranja tim agensima nije došlo do aktivacije nikakvog oblika stanične smrti te da je integritet membrane očuvan.
- CSE je samostalno i u kombinaciji s rhHsp70 povećao katalitičku aktivnost LDH što ukazuje na aktivaciju stanične smrti – piroptoze ili nekroptoze tj. upućuje da je narušen integritet membrane.
- Povećanje ekspresije IL-1β i kaspaze-1 ukazuju na to da je aktivirana piroptoza.
- Do aktivacije nekroptoze dolazi nakon tretiranja stanica CSE-om i s rhHsp70 proteinom te njihovim kombinacijama što se vidi aktivacijom MLKL.
- Aktivaciju RIPK1 nije uzrokovao niti jedan agens niti bilo koja od kombinacija agenasa.
- Kombinacija LPS ili LTA s rhHsp70 dovele su do smanjenja ekspresije mRNA za IL-1β što upućuje na moguće zaštitno djelovanje tih kombinacija.

7. LITERATURA

1. Aglietti RA, Dueber EC. Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends in Immunology*, 2017, 38, 261-271
2. Asea A, Kabingu E, Stevenson MA, Calderwood SK. HSP70 peptidembearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones*, 2000, 5, 425-431.
3. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138, 16-27.
4. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflamation. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7, 99-109.
5. 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.
6. Bohannon JK, Hernandez A, Enkhbaatar P, Adams WL, Sherwood ER. The Immunobiology of TLR4 Agonists: From Endotoxin Tolerance to Immunoadjuvants. *Shock*, 2013, 40, 451-462.
7. Borges TJ, Wieten L, Van Herwijnen MJC, Broere F, Van derZee R, Bonorino C, Van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Fronties in Immunology*, 2012, 3, 1-8.
8. Brusselle GG, Provoost S, Bracke KR, Kuchmiy A, Lamkanfi M. Inflammasomes in Respiratory Disease. *CHEST*, 2014, 145, 1211-1133.
9. Chan SL, Yu VC. Proteins of the Bcl-2 Family in Apoptosis Signalling: From Mechanistic Insights to Therapeutic Opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31, 119-128.
10. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2001, 18, 50-59.
11. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, de Matos C, Russel RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167, 24-31.
12. 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.

13. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 2018, 15, 199.
14. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G, Interleukin-18 and IL18 binding protein. *Front. Immunol*, 2013, 4, 289.
15. Dong J, Guo L, Liao Z, Zhang M, Zhang M, Wang T, Chen L, Xu D, Feng Y, Wen F. Increased expression on heat shock protein 70 in chronic obstructive pulmonary disease. *International Immunopharmacology*, 2013, 17, 885 – 893
16. Duprez L, Wirawan E, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and infection*, 2009, 11(13), 1050-1062.
17. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: Oxidative stress, protease-antiprotease imbalance and inflammation. *Int J COPD*, 2011, 6, 413–421.
18. Fu JJ, Mao B, Wang SJ, Xiao W, Li GH, Wu LH. The activation of NLRP3 inflammasome pathway in COPD is limited in local airways. *European Respiratory Journal*, 2018, 52, 618-629.
19. Giffard RG, Han R, Emery JF, Duan M, Pittet JF. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia – the complex roles of Heat Shock Protein 70. *Anesthesiology*, 2008, 109, 339-348.
20. Giuliano JS, Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J*, 2011, 4, 49–60.
21. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD), 2019, www.goldcopd.org, pristupljeno 21. kolovoza 2019.
22. Grabiec AM, Hussell T. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Semin Immunopathology*, 2016, 38, 409-423.
23. Hammad DR, Elgazzar AG, Essawy TS, El Sameie SAA. Evaluation of serum interleukin-1 beta as an inflammatory marker in COPD patients. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 2015, 347-352.
24. 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.
25. Hulina A. (2018) Uloga izvanstaničnog proteina Hsp70 i njegovih receptora u kroničnoj opstrukcijskoj plućnoj bolesti. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

26. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, Kato S, Iwasaki H, Watanabe K, Aizawa H. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur. Respir. J*, 2008,31, 287–297.
27. Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*, 2006, 79, 425–434.
28. Kennedy D, Jäger R, Mosser DD, Samali A. Regulation of Apoptosis by Heat Shock Proteins. *IUBMB Life*, 2014, 66, 327-338.
29. Kwak MS, Lim M, Lee YJ, Lee HS, Kim YH, Youn JH, Choi JE, Shin JS. HMGB1 Binds to Lipoteichoic Acid and Enhances TNF-α and IL-6 Production through HMGB1-Mediated Transfer of Lipoteichoic Acid to CD14 and TLR2. *J Innate Immun*, 2015, 7, 405-416.
30. Landis SH, Muellerova H, Mannino DM. Continuing to Confront COPD International Patient Survey: methods, COPD prevalence, and disease burden in 2012-2013. *Int J Chr Obs Pulmon Dis*, 2014, 9, 597-611.
31. Lange P, Celli B, Agusti A, Jensen GB, Divo M, Faner R, Guerra S, Marott JL, Martinez FD, Martinez-Camblor P, Meek P, Owen CA, Petersen H, Pinto-Plata V, Schnohr P, Sood A, Soriano JB, Tesfaigzi Y, Vestbo J. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*, 2015, 373, 111-122.
32. Li C, Zhihong H, Wenlong L, Xiaoyan L, Qing C, Wenzhi L, Siming X, Shengming L. The NLRP3 inflammasome regukates bronchial epithelial cell injury and pro – apoptosis after exposure to biomass fuel smoke. *AJRCMB Articles in Press*, 2016, 55, 3-17.
33. Liu X, Liebermann J. A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection. *Adv Immunol*, 2017, 135, 81-117.
34. Lorne E, Dupont H, Abraham E. Toll-like receptors 2 and 4: initiators of nonseptic inflammation in critical care medicine? Intensive Care Med, 2010, 36, 1826-1835.
35. MacNee W. Oxidants and COPD Curr Drug Target -Inflammation. *Allergy*, 2005, 4, 627–641.
36. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev*, 2015, 265, 6-21.
37. Mercado N, Ito K, Barnes PJ. Accelerated ageing oft he lung in COPD: new concepts. *Thorax*, 2015, 70(5), 482-9.

38. Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T, Glass K, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AMK. Mitophagy- dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *The Journal of Clinical Investigation*, 2014, 124(9), 3987-4003.
39. Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2016, 7, 1-9.
40. 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. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1812, 1104-1110.
41. Mukherjee S, Karmakar S, Babu SPS. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Braz J Infect Dis*, 2016, 20, 193-204.
42. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is aunique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12, 53–72.
43. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-γ production by T cells. *Nature*, 1995, 378, 88–91.
44. Opitz B, Van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181, 1294–1309.
45. Pinkerton JW, Kim RY, Robertson AAB, Hirota JA, Wood LG, Knight DA, Cooper MA, O'Neill LAJ, Horvat JC, Hansbro PM. Inflammasomes in the lung. *Molecular Immunology*, 2017, 86, 44-55.
46. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet*, 2003, 362, 469–476.
47. Pouwels SD, Heijink IH, ten Hacken NHT, Vandenabeele P, Krysko D V, Nawijn MC, van Oosterhout a JM. DAMPs activating innate and adaptive immune responses in COPD. *Mucosal Immunol*, 2014, 7, 215–226.
48. 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. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20, 885-892.
49. Sandor F, Buc M. Toll-like Receptors. I. Structure, Function and Their Ligands. *Folia Biologica*, 2005, 51, 148-156.

50. Sapey E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, Stockley RA. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonist sin stable COPD. *J Clin Immunol*, 2009, 29, 508-516.
51. Sawada M, Kawayama T, Imaoka H, Sakazaki Y, Oda H, Takenaka S, Kaku Y, Azuma K, Tajiri M, Edakuni N, Okamoto M, Kato S, Hoshino T. IL-18 induces airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation via CD4+ T cell and IL-13. *PLoS One*, 2013, 8(1), 1-8.
52. 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, 21, 1-8.
53. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*, 2016, 213, 617-629.
54. Sharma D, Masison DC. Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein Pept Lett*, 2009, 16(6), 571–581.
55. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer HD. Caspase-1: The inflammasome and beyond. *Innate Immun*, 2014, 20, 115-125.
56. Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet*, 2007, 370, 758-764.
57. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 2005, 365(9478), 2225-2236.
58. Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol*, 2016, 100, 961-967.
59. Tashkin DP, Altose MD, Bleecker ER, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise R. The Lung Health Study: Airway Responsiveness to Inhaled Methacholine in Smokers with Mild to Moderate Airflow Limitation. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145, 301-310
60. Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 2012, 122, 2749–2755.
61. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*, 2017, 277, 76-89.
62. Van der Toorn M, Slebos DJ, 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, 1211-1218.

63. Vande Walle L, Lamkanfi M. Pyroptosis. *Current Biology*, 2016, 26(13), 568-572.
64. Vanden Berghe T, Linkerman A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(2), 135-147.
65. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecuar mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11, 700-714.
66. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, Maio S, Baldacci S, Carozzi L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J*, 2007, 30, 993-1013.
67. Wang H, Lv C, Wang S, Ying H, Weng Y, Yu W. NLRP3 Inflammasome Involves in the Acute Exacerbation of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Inflammation*, 2018, 41(4), 1321-1333.
68. Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activity and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res*, 2012, 318, 1213-1220.
69. Xu YJ, Zheng L, Hu YW, Wang Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clin Chim Acta*, 2018, 476, 28-37.
70. Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkerman A, Ma D. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death & Disease*, 2015, 6(11), 1975.
71. Zou Y, Chen X, Liu J, et al. Serum IL-1β and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12, 1247–1254.

8. SAŽETAK / SUMMARY

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je bolest karakterizirana nedostatnim protokom zraka kroz pluća. U patogenezi KOPB-a bitnu ulogu imaju oksidacijski stres i upalni procesi, jer do opstrukcije dišnih putova dolazi zbog kronične upale dišnih putova i razaranja parenhima čime se gubi alveolarna povezanost i elastičnost pluća. Patogeneza KOPB-a povezana je s različitim oblicima stanične smrti te štetnim tvarima od kojih se cigaretni dim smatra najopasnijim.

Istraživanje je provedeno na 16-HBE bronhijalnim epitelnim stanicama. Ispitano je djelovanje rhHsp70 (0,3, 1 i 3 μg/mL), LPS-a (0,1 μg/mL), LTA (1 μg/mL) i CSE-a (2,5 i 15 %) te njihovih kombinacija. Cilj 24 satnog tretiranja bio je utvrditi dolazi li, i u kojim koncentracijama ovih agenasa, do aktivacije NLRP3 inflamasoma, nekroptoze i piroptoze. Aktivacija NLRP3 inflamasoma i upalni odgovor ispitani su određivanjem ekspresije mRNA za NLRP3, kaspazu-1 i upalni citokin IL-1β kvantitativnim PCR-om. Vijabilnost stanica ispitana je određivanjem aktivnosti LDH izlučene u medij iznad stanica, a njihov način umiranja ispitan je određivanjem ekspresije mRNA za kaspazu-1 i IL-1β, aktivacije proteina RIPK1 i MLKL te ekspresije proteina gasdermina D Western blot analizom.

Do pojačane ekspresije mRNA za NLRP3, IL-1β i kaspazu-1 dolazi nakon pojedinačnog tretiranja stanica s rhHsp70, LPS-om i LTA-om te nakon tretiranja CSE-om pojedinačno i u kombinaciji s rhHsp70. To ukazuje na aktivaciju NLRP3 inflamasoma i upalu. Katalitička aktivnost LDH povećana je samo nakon tretiranja s CSE-om i kombinacijama CSE i rhHsp70 što znači da CSE narušava integritet stanične membrane i aktivira staničnu smrt. Povećanje ekspresije mRNA za IL-1β i kaspazu-1 te povećanje ekspresije proteina gasdermina D ukazuju na aktivnost piroptoze. RIPK1 i MLKL eksprimirane su u svim stanicama no do aktivacije MLKL dolazi samo nakon tretiranja s CSE-om pojedinačno i u kombinacijama s rhHsp70 što upućuje na nekroptozu.

Ključne riječi: KOPB, NLRP3 inflamasom, nekroptoza, piroptoza

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease characterized by insufficient flow of air through the lungs. In the pathogenesis of COPD, oxidative stress and inflammatory processes have an essential role due to chronic inflammation of the airways and destruction of parenchyma which leads to lost of alveolar connectivity and lung elasticity. COPD pathogenesis is associated with various forms of cell death and harmful substances of which cigarette smoke is considered the most dangerous.

The study was conducted on 16-HBE bronchial epithelium cells. The effects of rhHsp70 (0.3, 1 and 3 μg/mL), LPS (0.1 μg/mL),LTA (1 μg/mL) and CSE (2,5 and 15%) and their combinations were assessed. The aim of 24-hour treatment was to determine whether, and at what concetrations of these agents, the activation of NLRP3 inflammasomes, necroptosis and pyroptosis occur. Activation of NLRP3 inflammasome and inflammatory response were assessed by determining the level of expression for NLRP3, caspase-1, and inflammatory cytokine IL-1β mRNA by quantitative PCR. Cell viability was determinated by LDH activity in the media above the cells and their mode of dying was explored by determining the expression of mRNA for caspase-1 and IL-1β, as well as activation of RIPK1 and MLKL proteins and expression of the protein gasdermin D by Western blot analysis. The increased expression of mRNA for NLRP3, IL-1 β and caspase-1 comes after individual treatment of cells with rhHsp70, LPS and LTA and after treatment with CSE individually and in combination with rhHsp70. This indicates the activation of NLRP3 inflammasome and inflammation. The catalytic activity of LDH is increased only after treatment with CSE and CSE and rhHsp70 combination, which means that CSE disrupts cell membrane integrity and activates cellular death. An increase in the expression of mRNA for IL-1 β and caspase-1 and an increase in the expression of gasdermin D protein indicate the activity of pyroptose. RIPK1 and MLKL are exported to all cells but the MLKL activation only occurs after treatment with the CSE individually and in combinations with rhHsp70, indicating necroptosis. Some combinations of rhHsp70 with LPS and LTA show possible protective effects.

Keywords: COPD, NLRP3 inflammasome, necroptosis, pyroptosis

9. PRILOZI

9.1. Popis kratica

ALR	receptor sličan proteinu 2 odsutnom u melanomu (engl. absent in melanoma 2-like receptors)
ANOVA	jednosmjerna analiza varijance (engl. One Way Analysis of Variance)
Apaf-1	čimbenik 1 koji aktivira apoptozne proteaze (engl. apoptotic protease activating factor-1)
ASC	protein nalik mrljicama povezan s apoptozom koji sadrži domenu za aktivaciju i privlačenje kaspaza (engl. apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain)
ATP	adenozin-trifosfat
B2M	β2-mikroglobulin
BCA	bicinkonična kiselina
BH	Bcl-2 homologna domena
BSA	goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin)
CARD	domena za aktivaciju i privlačenje kaspaza (engl. caspase activation and recruitment domain)
CD14	biljeg diferencijacije 14 (engl. cluster of differentiation)
$cFLIP_L$	stanični FLICE-slični inhibitorni protein (engl. cellular FLICE-like inhibitory protein)
cIAP-1	stanični protein 1 koji inhibira apoptozu (engl. cellular inhibitor of apoptosis protein 1)
Ct	ciklus umnažanja u qPCR-u u kojem je postignut prag detekcije signala
CYLD	deubikvintirajućI enzim cilindromatoza (engl. deubiquitinase cylindromatosis)
DAMP	molekularni obrazac oštećenja (engl. damage-associated molecular pattern)
DISC	signalni kompleks koji potiče smrt (engl. death inducing signaling complex)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleozid-trifostat
EDTA	etilendiamin-tetraoctena kiselina
eHsp70	izvanstanični Hsp70
FADD	protein koji ima domenu smrti i povezuje se s Fas-om (engl. Fasassociated

	death domain)
FBS	fetalni goveđi serum (engl. fetal bovine serum)
FRET	prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (engl. fluorescence energy resonance transfer)
GOLD	Globalna inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (engl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases)
GSDMD	gasdermin D
GSDMD-NT	N-terminalni fragment gasdermina D
16-HBE	humane bronhijalne epitelne stanice
HMGB1	protein B1 iz grupe proteina velike mobilnosti (engl. high mobility group box 1 protein)
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. horseradish peroxidase)
Hsp	protein toplinskog šoka (engl. heat shock protein)
IFN	interferon
IFN-γ	interferon-γ (engl. interferon-γ)
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IL-1R1	receptor za IL-1 (engl. interleukin-1 receptor)
IRF3	čimbenik regulacije interferona 3 (engl. interferon regulatory factor 3)
kDa	kilodalton
KOPB	kronična opstrukcijska plućna bolest
LAL	lizat limulusovih amebocita
LBP	protein koji veže LPS (engl. LPS binding protein)
LDH	laktat dehidrogenaza
Leu	leucin
LPS	lipopolisaharid (engl. lipopolysaccharide)
LRR	područja bogata leucinom (engl. leucine-rich repeat)
LTA	lipoteikoična kiselina (engl. lipoteichoic acid)
MD2	molekula koja veže lipopolisaharid (engl. molecule that confers lipopolysaccharide)
MLKL	protein s inaktivnom kinaznom domenom koja je eksprimirana u različitim vrstama (engl. mixed lineage kinase domain-like protein)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. messenger ribonucleic acid)

NaCl	natrij-klorid
NADH	nikotinamidadenin-dinukleotid
NF-Kb	jezgrin čimbenik kappa B (engl. nuclear factor kappa B)
NLR	receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (engl. nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor)
NLRP3	NLR receptor koji sadrži N-terminalnu pirinsku domenu tipa 3 (engl. NOD-like receptor pyrin 3)
NOD	oligomerizacijska domena koja veže nukleotide (engl. nucleotide-binding oligomerization domain)
NT	netretirane stanice
PAMP	molekularni obrazac povezan s patogenima (engl. pathogen-associated molecular pattern)
PBS	otopina soli puferirana fosfatom (engl. phosphate buffer saline)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)
PPIA	peptidil-prolil-izomeraza A
PRR	receptor koji prepoznaje molekulske strukture (engl. pattern recognition receptor)
PYD	pirinska domena (engl. pyrin domain)
qPCR	kvantitativni PCR (engl. quantitative PCR)
rhHsp70	rekombinantni humani Hsp70
RAGE	receptor krajnjih produkata uznapredovale glikacije (engl. receptor for advanced glycation end-products)
RIG-1R	receptor sličan genu 1 kojeg inducira retinoična kiselina (engl. retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor)
RIPK	serin/treonin protein kinaza koja stupa u interakciju s receptorom (engl. receptor-interacting serin/threonine-protein kinase)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. reactive oxygen species)
SDS	natrij-dodecilsulfat
SDS-PAGE	diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u denaturirajućim uvjetima (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SEM	standardna pogreška (engl. standard error of mean)
Ser	serin

TAK1	kinaza 1 koju aktivira transformirajući čimbenik rasta β (engl. transforming growth factor-β-activated kinase 1)
TEMED	tetrametiletilen-diamin
THP-1	humani monociti iz periferne krvi porijeklom od bolesnika s akutnom monocitnom leukemijom
Thr	treonin
TIPSA	medij koji sadrži transferin, inzulin, penicilin, streptomicin i amfotericin B
TIR	citoplazmatska domena homologna Tollu i receptoru za interleukin-1 (engl. Toll/interleukin 1 receptor homology domain)
TLR	receptor sličan Tollu (engl. Toll-like receptor)
TNF	čimbenik nekroze tumora
TNF-α	čimbenik nekroze tumora α (engl. tumor necrosis factor α)
TNFR1	receptor 1 za čimbenik nekroze tumora
TRAILR	receptor za TNF-povezani inducirajući ligand za apoptozu (engl. TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor)

10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ULOGA INFLAMASOMA, NEKROPTOZE I PIROPTOZE U KRONIČNOJ OPSTRUKCIJSKOJ PLUĆNOJ BOLESTI

Ivana Marinić

SAŽETAK

Kronična opstrukcijska plućna bolest (KOPB) je bolest karakterizirana nedostatnim protokom zraka kroz pluća. U patogenezi KOPB-a bitnu ulogu imaju oksidacijski stres i upalni procesi, jer do opstrukcije dišnih putova dolazi zbog kronične upale dišnih putova i razaranja parenhima čime se gubi alveolarna povezanost i elastičnost pluća. Patogeneza KOPB-a povezana je s različitim oblicima stanične smrti te štetnim tvarima od kojih se cigaretni dim smatra najopasnijim.

Istraživanje je provedeno na 16-HBE bronhijalnim epitelnim stanicama. Ispitano je djelovanje rhHsp70 (0,3, 1 i 3 μg/mL), LPS-a (0,1 μg/mL), LTA (1 μg/mL) i CSE-a (2,5 i 15 %) te njihovih kombinacija. Cilj 24 satnog tretiranja bio je utvrditi dolazi li, i u kojim koncentracijama ovih agenasa, do aktivacije NLRP3 inflamasoma, nekroptoze i piroptoze. Aktivacija NLRP3 inflamasoma i upalni odgovor ispitani su određivanjem ekspresije mRNA za NLRP3, kaspazu-1 i upalni citokin IL-1β kvantitativnim PCR-om. Vijabilnost stanica ispitana je određivanjem aktivnosti LDH izlučene u medij iznad stanica, a njihov način umiranja ispitan je određivanjem ekspresije mRNA za kaspazu-1 i IL-1β, aktivacije proteina RIPK1 i MLKL te ekspresije proteina gasdermina D Western blot analizom.

Do pojačane ekspresije mRNA za NLRP3, IL-1β i kaspazu-1 dolazi nakon pojedinačnog tretiranja stanica s rhHsp70, LPS-om i LTA-om te nakon tretiranja CSE-om pojedinačno i u kombinaciji s rhHsp70. To ukazuje na aktivaciju NLRP3 inflamasoma i upalu. Katalitička aktivnost LDH povećana je samo nakon tretiranja s CSE-om i kombinacijama CSE i rhHsp70 što znači da CSE narušava integritet stanične membrane i aktivira staničnu smrt. Povećanje ekspresije mRNA za IL-1β i kaspazu-1 te povećanje ekspresije proteina gasdermina D ukazuju na aktivnost piroptoze. RIPK1 i MLKL eksprimirane su u svim stanicama no do aktivacije MLKL dolazi samo nakon tretiranja s CSE-om pojedinačno i u kombinacijama s rhHsp70 što upućuje na nekroptozu.

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

Rad sadrži: 68 stranica, 16 grafičkih prikaza i 71 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: KOPB, NLRP3 inflamasom, nekroptoza, piroptoza

Mentor: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Petra Turčić, *docentica 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

ROLE OF INFLAMMASOME, NECROPTOSIS AND PYROPTOSIS IN CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

Ivana Marinić

SUMMARY

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a disease characterized by insufficient flow of air through the lungs. In the pathogenesis of COPD, oxidative stress and inflammatory processes have an essential role due to chronic inflammation of the airways and destruction of parenchyma which leads to lost of alveolar connectivity and lung elasticity. COPD pathogenesis is associated with various forms of cell death and harmful substances of which cigarette smoke is considered the most dangerous.

The study was conducted on 16-HBE bronchial epithelium cells. The effects of rhHsp70 (0.3, 1 and 3 μg/mL), LPS (0.1 μg/mL),LTA (1 μg/mL) and CSE (2,5 and 15%) and their combinations were assessed. The aim of 24-hour treatment was to determine whether, and at what concetrations of these agents, the activation of NLRP3 inflammasomes, necroptosis and pyroptosis occur. Activation of NLRP3 inflammasome and inflammatory response were assessed by determining the level of expression for NLRP3, caspase-1, and inflammatory cytokine IL-1β mRNA by quantitative PCR. Cell viability was determinated by LDH activity in the media above the cells and their mode of dying was explored by determining the expression of mRNA for caspase-1 and IL-1β, as well as activation of RIPK1 and MLKL proteins and expression of the protein gasdermin D by Western blot analysis. The increased expression of mRNA for NLRP3, IL-1 β and caspase-1 comes after individual treatment of cells with rhHsp70, LPS and LTA and after treatment with CSE individually and in combination with rhHsp70. This indicates the activation of NLRP3 inflammasome and inflammation. The catalytic activity of LDH is increased only after treatment with CSE and CSE and rhHsp70 combination, which means that CSE disrupts cell membrane integrity and activates cellular death. An increase in the expression of mRNA for IL-1 β and caspase-1 and an increase in the expression of gasdermin D protein indicate the activity of pyroptose. RIPK1 and MLKL are exported to all cells but the MLKL activation only occurs after treatment with the CSE individually and in combinations with rhHsp70, indicating necroptosis.

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

Thesis includes: 68 pages, 16 figures and 71 references. Original is in Croatian language.

Keywords: COPD, NLRP3 inflammasome, necroptosis, pyroptosis

Mentor: **Marija Grdić Rajković**, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Grdić Rajković**, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali Čepo, **Ph.D,** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Petra Turčić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.