Utjecaj agonista TLR receptora na vijabilnost THP-1 humanih monocitnih stanica

Smoljanović, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:111975

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Tina Smoljanović

Utjecaj agonista TLR receptora na vijabilnost THP-1 humanih monocitnih stanica

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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



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

Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na ljubaznosti i pomoći, posebno prof. dr. sc. Ladi Rumora, pod čijim je mentorstvom izrađen ovaj rad, na strpljenju, vođenju kroz izradu rada i prijenosu znanja te asistentici Andrei Hulina na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i statističkoj obradi podataka.

SADRŽAJ

1. **UVOD** 1

1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest 2

1.1.1. Definicija 2

1.1.2. Prevalencija i troškovi 2

1.1.3. Čimbenici rizika 3

1.1.4. Dijagnoza i klasifikacija bolesti 4

1.2. Patologija, patogeneza i patofiziologija KOPB-a 6

1.2.1. Patogeneza 6

1.2.2. Patofiziologija 7

1.3. Uloga imunosnog sustava u KOPB-u 8

1.3.1. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture 8

1.3.2. Struktura i ligandi TLR receptora 8

1.3.3. Signalni put TLR receptora 10

1.3.4. Uloga TLR receptora u KOPB-u 11

1.3.5. Djelovanje LTA i LPS-a na TLR2 i TLR4 receptore 12

2. **OBRAZLOŽENJE TEME** 13

3. **MATERIJALI I METODE** 15

3.1. Kultura stanica 16

3.1.1. Presađivanje stanica 16

3.1.2. Tretiranje stanica 16

3.2. Priprema staničnih lizata 17

3.3. Test vijabilnosti i brojanje stanica tripanskim plavilom 17

3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH 19

3.5. MTS test 20
3.6. Statistička obrada rezultata 21
4. **REZULTATI I RASPRAVA** 22
4.1. Određivanje optimalnog broja stanica i uvjeta kultiviranja za LDH test 23
4.2. Utjecaj načina pripreme staničnih lizata na katalitičku aktivnost LDH 25
4.3. Utjecaj temperature, stajanja uzorka i inhibitora proteaza na aktivnost LDH 26
4.4. Određivanje optimalnog broja stanica i vremena inkubacije za MTS test 28
4.5. Utjecaj LTA i LPS-a na vijabilnost THP-1 stanica 31
4.5.1. Određivanje vijabilnosti mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH 31
4.5.2. Određivanje vijabilnosti MTS testom 35
5. **ZAKLJUČCI** 39
6. **LITERATURA** 42
7. **SAŽETAK/SUMMARY** 50
8. **PRILOZI** 53
8.1. Popis kratica 54
9. **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD** 56

1. UVOD

1.1. Kronična opstrukcijska plućna bolest

1.1.1. Definicija

Kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) je kronična bolest pluća karakterizirana stalnim smanjenim protokom zraka kroz dišne putove. Simptomi KOPB-a se postupno pogoršavaju, od gubitka daha pri naporu do otežanog disanja tijekom mirovanja. To po život opasno i neizlječivo stanje često nije na vrijeme prepoznato od strane liječnika jer se radi o vrlo heterogenoj bolesti s kliničkom slikom koja se razlikuje od slučaja do slučaja (World Health Organization, 2007). Često se koristi zajedno s pojmovima emfizem i kronični bronhitis koji su se nekad koristili kao definicija KOPB-a, a danas predstavljaju smjernice za dijagnozu. Glavnim uzročnikom KOPB-a smatra se dim cigareta, ali identificirani su i brojni drugi rizični čimbenici. Obzirom da je KOPB neizlječiva bolest, terapija je usmjerena na olakšanje simptoma, povećanje kvalitete života i smanjenja rizika od smrti, a danas se sve veći naglasak stavlja i na prevenciju bolesti (www.who.int).

1.1.2. Prevalencija i troškovi

Postojeći podaci o prevalenciji razlikuju se zbog razlika u metodama, dijagnostičkim kriterijima i analitičkom pristupu (Mathers i Loncar, 2006). Prema istraživanju koje se bavilo izračunom opterećenja KOPB-a za društvo (BOLD, *engl*. Burden of Lung Disease) i drugim velikim epidemiološkim istraživanjima, broj slučajeva KOPB-a procjenjuje se na 384 milijuna u 2010., s prevalencijom u svijetu od 11,7 % (95 %, CI 8,4 – 15,0 %) (Adeloye i sur., 2015). Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, *engl*. World Health Organization) u 2015. godini od KOPB-a je umrlo 3,2 milijuna ljudi, što je učinilo KOPB 4. najvećim uzrokom smrti u svijetu, a prema projekcijama za 2030. godinu KOPB će odnijeti 4,6 milijuna života i postati 3. vodeći uzrok smrti u svijetu (www.who.int).

KOPB također predstavlja i značajno financijsko opterećenje za zdravstveni sustav. (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017) U Europi, ukupni troškovi za bolesti dišnog sustava su procijenjeni na 96,4 milijarde dolara, od čega izdvajanja za KOPB čine 42 % (http://www.erswhitebook.org/). U Sjedinjenim Američkim Državama, KOPB je treći vodeći uzrok smrti te izravni i neizravni troškovi povezani s KOPB-om u 2010. godini procijenjeni su na 49,9 milijardi dolara (Guarascio i sur., 2013).

Najveći dio troškova vezanih uz zbrinjavanje KOPB-a odnosi se na egzacerbacije te s većom učestalošću egzacerbacija i progresijom bolesti troškovi vezani za zbrinjavanje KOPB-a dalje

rastu. U zemljama u razvoju, izravni troškovi KOPB-a za zdravstveni sustav su manje važni od onih neizravnih koji su povezani s utjecajem KOPB-a na produktivnost na radnom mjestu. Obzirom da zdravstveni sustavi ponekad ne pružaju dugoročnu njegu za oboljele od KOPB-a, ponekad uz oboljelog radno mjesto mora napustiti i član obitelji koji će se za njega skrbiti. U državama u razvoju, u kojima je ljudski kapital najvredniji nacionalni resurs, neizravni troškovi KOPB-a predstavljaju ozbiljnu prijetnju ekonomskom razvoju (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

1.1.3. Čimbenici rizika

Primarni uzročnik KOPB-a je dim cigareta (uključujući i pasivne pušače), dok ostali rizični čimbenici uključuju onečišćen zrak u unutarnjim prostorima koji nastaje, primjerice, izgaranjem krutih goriva, onečišćen zrak u vanjskim prostorima, izloženost prašini i kemikalijama na radnom mjestu te česte infekcije donjih dišnih putova u djetinjstvu (www.who.int).

Kod pušača je uočena veća prevalencija simptoma dišnih bolesti i abnormalnosti plućne funkcije, veća godišnja razina smanjenja forsiraninog izdisajnog volumena u jednoj sekundi (FEV_1, *engl*. forced expired volume in 1 second) i veća smrtnost od KOPB-a nego kod nepušača (Kohansal i sur., 2009). Pasivno izlaganje cigaretnom dimu također može pridonijeti pojavi simptoma dišnih bolesti i pojavi KOPB-a (Jiang i sur., 2007).

Istraživanje iz 2006. koje se bavilo procjenom prevalencije KOPB-a u svijetu ustanovilo je da je prevalencija KOPB-a veća, osim kod pušača u usporedbi s nepušačima, i kod muškaraca u odnosu na žene, kod osoba starijih od 40 godina te kod osoba koje žive u urbanim sredinama (Halbert i sur., 2006). Danas je prevalencija KOPB-a među muškarcima i ženama približno jednaka (www.who.int).

Od genetskih čimbenika, najbolje je dokumentirana ozbiljna nasljedna deficijencija alfa 1 antitripsina, važnog inhibitora serinskih proteaza (Stoller i Aboussouan, 2005). Povećan obiteljski rizik od opstrukcije dišnih putova uočen je kod pušača koji su u rodu s oboljelima od teškog KOPB-a, što ukazuje na zajednički utjecaj genetike i okolišnih čimbenika (McCloskey i sur., 2001).

Čimbenici koji utječu na rast pluća tijekom gestacije i djetinjstva također imaju potencijal za povećanje rizika od razvoja KOPB-a. U predviđaju funkcije pluća kod odraslih nepovoljni okolišni uvjeti za razvoj pluća u djetinjstvu čine se jednako važni kao teško pušenje (Lawlor i sur., 2005). U istraživanju iz 2015. evaluirane su tri različite longitudinalne kohorte i otkriveno je da je otprilike 50 % pacijenata razvilo KOPB zbog abnormalnog rasta i razvoja

pluća (Kim i sur., 2015). Pušenje tijekom trudnoće predstavlja rizik za fetus, utječući na rast i razvoj pluća *in utero* (Tager i sur., 1995).

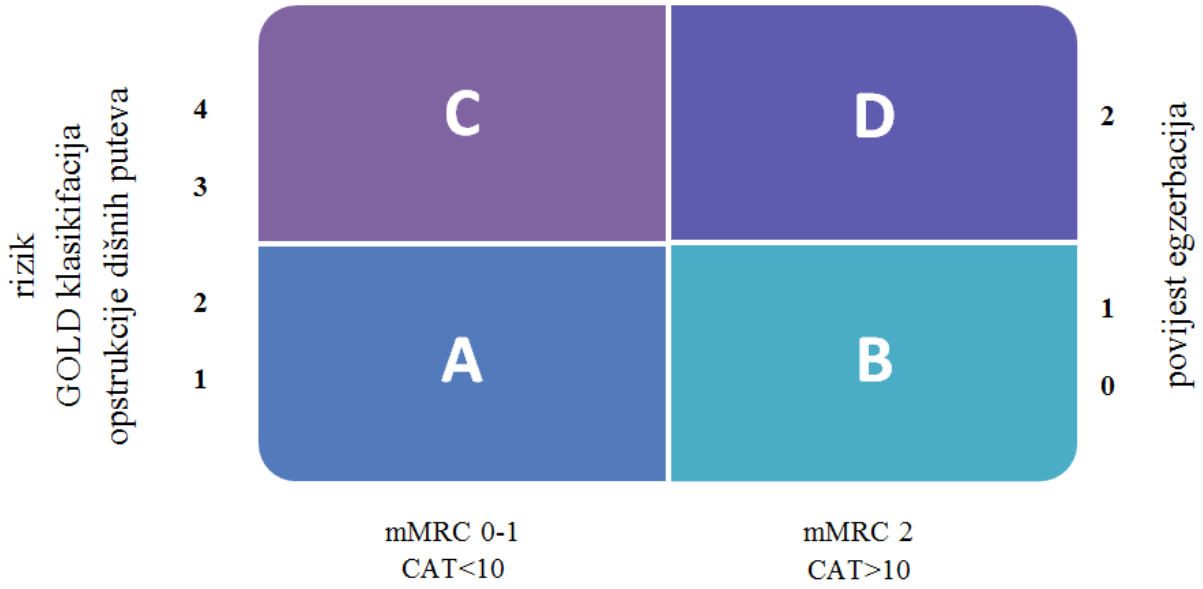
Okupacijska izlaganja, uključujući organsku i anorgansku prašinu, kemijske agense i pare su podcijenjen čimbenik rizika za KOPB (Paulin i sur., 2015). Drvo, životinjski izmet, biljni ostaci i ugljen, paljeni u otvorenoj vatri ili slabo funckionalnim pećima, mogu dovesti do visokog onečišćenja zraka u zatvorenim prostorima (Orozco-Levi i sur., 2006). Gotovo tri milijarde ljudi diljem svijeta koriste biomasu i ugljen kao glavni izvor energije tako da je rizik diljem populacije vrlo velik (Assad i sur., 2015).

Astma je također potencijalni rizični čimbenik za razvoj kronične opstrukcije dišnih putova i KOPB-a, povećavajući rizik za oboljenje od KOPB-a kod odraslih 12 puta (Silva i sur., 2004). U istraživanju provedenom na mlađim osobama u Europi, preosjetljivost dišnih putova ističe se kao drugi vodeći čimbenik rizika za KOPB (nakon pušenja), odgovorno za 15 % rizika u populaciji (de Marco i sur., 2010). Kod mlađih pušača, prisutstvo kroničnog bronhitisa povezano je s većom vjerojatnosti pojave KOPB-a (Guerra i sur., 2009). Kronični bronhitis je također povezan s većim brojem i snažnijim egzacerbacijama kod KOPB-a (Kim i sur., 2011).

U konačnici, jasno je da je KOPB rezultat kompleksne interakcije između gena i okoliša s pušenjem kao vodećim okolišnim čimbenikom, no razumijevanje veza i interakcije među pojedinim čimbenicima zahtijeva daljnje istraživanje (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

1.1.4. Dijagnoza i klasifikacija bolesti

KOPB treba razmotriti kod svakog pacijenta koji ima dispneju, kronični kašalj, produkciju sputuma i/ili povijest izlaganja rizičnim čimbenicima (Buist i sur., 2007). Prema najnovijim GOLD smjernicama, osim rezultata spirometrije za procjenu težine bolesti bitno je razmatrati i prisutnost simptoma bolesti, rizik od egzacerbacija te prisutnost komorbiditeta. ABCD sustav za procjenu obuhvaća ta 4 parametra te prema njima svrstava oboljele od KOPB-a u jednu od 4 kategorije (A, B, C, D) (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).



Slika 1. Test za procjenu težine KOPB-a koji kombinira procjenu težine simptoma, povijest egzacerbacija i prisustvo komorbiditeta. Modificirani upitnik Vijeća za medicinska istraživanja (mMRC, *engl*. modified Medical Research Council) koristi se za procjenu težine dispneje, GOLD ocjena 1 – 4 za procjenu opstrukcije dišnih putova, te test za procjenu KOPB-a (CAT™ , *engl*. COPB Assessment Test) za procjenu narušenosti zdravstvenog stanja pacijenta (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

kategorija pacijenta	karakteristike	spirometrijska klasifikacija	broj egzacerbacija u godini	mMRC	CAT
A	nizak rizik, rijetki simptomi	GOLD 1 – 2	1	0 – 1	<10
B	nizak rizik, češći simptomi	GOLD 1 – 2	1	2	10
C	visok rizik, rijetki simptomi	GOLD 3 – 4	2	0 – 1	<10
D	visok rizik, češći simptomi	GOLD 3 – 4	2	2	10

Tablica 1. Prikaz podjele bolesnika s KOPB-om po skupinama A – D (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

Nalaz spirometrije, u kombinaciji s pacijentovim simptomima i povijesti egzacerbacija ključan je za dijagnozu, prognostiku i odabir terapije KOPB-a (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

1.2. Patologija, patogeneza i patofiziologija KOPB-a

Patološke promjene karakteristične za KOPB nalaze se u dišnim putovima, plućnom parenhimu i plućnoj vaskulaturi. Patološke promjene obuhvaćaju kroničnu upalu s povećanim brojem specifičnih upalnih stanica u različitim dijelovima pluća i strukturalne promjene nastale zbog ponavljajućih epizoda ozljede i popravka tkiva (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017). Kod svih pušača možemo uočiti znakove upale u plućima, ali kod onih kod kojih se razvije KOPB imamo pojačan ili abnormalan odgovor na udisanje toksičnih tvari. Ovaj pojačani odgovor može rezultirati hipersekrecijom mukusa (kronični bronhitis), uništenjem tkiva (emfizem), te ometanjem mehanizama obrane organizma i popravka tkiva što vodi do upale malih dišnih putova i fibroze (bronhiolitis) (MacNee, 2006). Upalne i strukturne promjene u dišnim putovima se povećavaju s težinom bolesti i zadržavaju na istom stupnju kod prestanka pušenja (većina podataka odnosi se na istraživanja s pušačima) (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

1.2.1. Patogeneza

Upala uočena u dišnim putovima kod oboljelih od KOPB-a čini se kao modificirani normalni upalni odgovor dišnih putova na kronične iritanse kao što je dim cigareta. Pretpostavlja se da pluća odgovaraju na relativno male promjene u koncentraciji atmosferskih onečišćenja i povećavaju stvaranje upalnih citokina i njihovo otpuštanje u cirkulaciju. To vodi do povećanog stavranja proteina akutne faze u jetri i otpuštanja leukocita u krv (Hoog i sur., 2004). *In vitro* istraživanja na humanim alveolarnim makrofagima su pokazala da te stanice kada su izložene atmosferskim česticama sintetiziraju širok spektar upalnih citokina što uključuje čimbenik nekroze tumora α (TNF, engl. tumor necrosis factor α), interleukin-1β (IL-1β, engl. interleukin-1β), interleukin-6 (IL-6, engl. interleukin-6) i brojne druge (van Eeden i sur., 2001).

Osim upalnih medijatora i upalnih stanica povezanih s kroničnim upalnim odgovorom, ulogu još imaju oksidacijski stres, neravnoteža proteaza i antiproteaza, peribronhijalna i intersticijska fibroza (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

Oksidacijski stres smatra se važnim pojačavajućim mehanizmom u KOPB-u, a karakterizira ga povećana količina biomarkera poput vodikovog peroksida i 8-izoprostana u izdahnutom zraku, sputumu i u sistemskoj cirkulaciji (Domej i sur., 2014). Oksidansi nastaju u organizmu kao posljedica udisanja dima cigareta i drugih štetnih čestica, te ih otpuštaju aktivirane upalne stanice kao što su makrofagi i neutrofili (Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease, 2017).

Postoje dokazi da u plućima oboljelih od KOPB-a dolazi do neravnoteže između proteaza koje razgrađuju vezivno tkivo i antiproteaza koje inhibiraju njihovo djelovanje (Stockley, 1999). Elastin je važan sastojak vezivnog tkiva plućnog parenhima, a njegova razgradnja proteazama smatra se važnom značajkom emfizema (Johnson, 2016).

KOPB je karakterizirana povećanim brojem makrofaga u perifernim dišnim putovima, plućnom parenhimu i plućnim krvnim žilama, skupa s povećanim aktiviranim neutrofilima i povišenim limfocitima što uključuje Tc1, Th1 i Th17 (Tc, citotoksični T limfociti, *engl*. cytotoxic T lymphocyte; Th, T pomagačke stanice, *engl*. T-helper cells). Sve ove stanice otpuštaju brojne upalne medijatore (Barnes, 2016). Upalni medijatori dalje privlače upalne stanice iz cirkulacije, pojačavaju upalni proces i potiču strukturne promjene (Barnes, 2014).

1.2.2. Patofiziologija

Navedeni patogenetski mehanizmi rezultiraju patološkim promjena u KOPB-u koji rezultiraju fiziološkim abnormalnostima – hipersekrecija mukusa, disfunkcija cilija, opstrukcija dišnih putova i hiperinflacija, promjene u izmjeni plinova, plućna hipertenzija i sistemski efekti.

Hipersekrecija mukusa rezultira kroničnim produktivnim kašljem, što je karakteristika kroničnog bronhitisa, ali nije nužno povezana s opstrukcijom dišnih putova i ne javlja se kod svih oboljelih od KOPB-a. Disfunkcija cilija vodi do poremećaja mukocilijarnog aparata i poteškoća u iskašljavanju. Primarno mjesto opstrukcije dišnih putova su mali dišni putovi promjera manjeg od 2 mm u pozadini čega se nalazi upala, sužavanje dišnih putova zbog remodeliranja i prisutstvo upalnog eksudata. Zbog opstrukcije dišnih putova dolazi do zadržavanja zraka tijekom izdisaja što vodi do hiperinflacije u odmoru i dinamičke hiperinflacije tijekom fizičke aktivnosti. Hiperinflacija smanjuje udisajni kapacitet i funkcionalni rezidualni kapacitet tijekom fizičke aktivnosti. Zbog toga se kod oboljelih javlja gubitak daha i ograničen kapacitet za vježbanje karakterističan za KOPB. Ograničenje protoka zraka u KOPB-u se najbolje mjeri spirometrijom koja je preduvjet za dijagnozu te je za nalaze spirometrije kod oboljelih od KOPB-a karakterističan smanjen FEV_1. U naprednoj fazi bolesti javlja se poremećaj u izmjeni plinova i plućna hipertenzija. Sistemska upala i

oštećenja skeletnih mišića pridonose otežanju vježbanja i pogoršavaju prognozu neovisno o stupnju opstrukcije (MacNee, 2006).
Egzacerbacije su često povezane s upalom s povećanim brojem neutrofila, i kod nekih blažih egzacerbacija, povećanim brojem eozinofila. Mogu biti uzrokovane bakterijskim i viursnim infekcijama, zagađenim zrakom i promjenama u temperaturi okoliša (MacNee, 2006).

1.3. Uloga imunosnog sustava u KOPB-u

Donji dišni putovi smatraju se sterilnom okolinom i invazija patogenih mikroorganizama predstavlja ozbiljnu prijetnju koja zahtjeva trenutan imunosni odgovor zahvaćenog organizma. Imunosni sustav u dišnim putovima sa svojim brojnim receptorima za prepoznavanje molekulske strukture ima neizostavnu ulogu u akutnim i kroničnim oboljenjima pluća (Opitz i sur., 2010).

1.3.1. Receptori koji prepoznaju molekulske strukture

Receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRR, *engl*. pattern recognition receptors) nalaze se na epitelnim i imunosnim stanicama te potiču upalni odgovor nakon susreta s molekulama koje potječu iz bakterija i virusa (PAMP, *engl*. pathogen-associated molecular pattern), odnosno endogenih molekula povezanih s oštećenjem tkiva (DAMP, *engl*. damage-associated molecular pattern) (Bezemer i sur., 2012).
Aktivacija PRR vodi otpuštanju citokina i kemokina koji privlače leukocite na mjesto infekcije i aktiviraju sazrijevanje antigen-prezentirajućih stanica za indukciju stečenog imuniteta (Lafferty i sur., 2010).
Jaka i/ili kronična stimulacija PRR receptora PAMP-ovima, DAMP-ovima i inhaliranim česticama uključena je u remodeliranje i razaranje plućnog parenhima koje potencijalno vodi k razaranju stijenki alveola, odnosno emfizemu (Opitz i sur., 2010).
Dosad je otkriveno nekoliko podskupina PRR receptora, među koje spadaju i receptori slični Toll receptoru Drosophila vrste (TLR, *engl*. Toll-like receptor). TLR receptori su se pokazali kao ključni indikatori mikrobioloških i ne-infektivnih antigena u dišnim putovima te medijatori domaćinovog stečenog imuniteta (Lafferty i sur., 2010).

1.3.2. Struktura i ligandi TLR receptora

Kod ljudi je dosad otkriveno 11 članova TLR porodice proteina (Takeda i sur., 2005). Sastoje se od izvanstanične domene važne u prepoznavanju egzogenih signala porijeklom iz bakterija

i virusa, a koju uglavnom čine ponavljajući slijedovi bogati leucinom (LRR, *engl*. leucine-rich repeat), te unutarstanične Toll/IL-1 receptorske domene (TIR, engl. Toll IL-1 receptor), koja je djelomično homologna kod TLR i IL-1 receptora te je važna za staničnu signalizaciju (Akira, 2003).

Postoje brojna istraživanja, uglavnom temeljena na TLR-*knockout* miševima čiji su rezultati utvrdili postojanje velikog broja različitih endogenih i egzogenih, odnosno mikrobioloških tvari koje se ponašaju kao ligandi za TLR receptore, iako je tek manji broj farmakoloških istraživanja potvrdio izravnu interakciju agonista s receptorom. Čak i kada je potvrđena izravna interakcija između agonista i receptora, kao na primjer u slučaju peptidoglikana s TLR2 receptorom, moguće je da ona nije izravno odgovorna za signalizaciju, s obzirom na to da kasnije istraživanja ukazuju da je za signalizaciju zapravo odgovorna lipoteikoična kiselina (LTA, *engl*. lipoteichoic acid), koja se kao kontaminant nalazi u uzorku peptidoglikana (Chaudhuri i sur., 2005; Iwaki, 2002; Travassos, 2004). Kod rekombinantnih proteina izoliranih iz E. Coli također imamo primjere kontaminacije, primjerice, pripravci proteina toplinskog šoka koji sadrže lipopolisaharid (LPS, *engl*. lipopolysaccharide), odgovoran za signalizaciju putom TLR4 receptora (Chaudhuri i sur., 2005).

Općenito, TLR2 i TLR4 smatraju se odgovornima za prepoznavanje lipida, posebice dijelove bakterijske stanične stijenke, pri čemu TLR2 dominantno funkcionira kao receptor za Gram-pozitivne, a LTR4 kao receptor za Gram-negativne organizme (Takeda i sur., 2003).

Tako, primjerice, TLR4 prepoznaje LPS iz stanične stijenke Gram-negativnih bakterija, dok TLR2, zajedno s TLR1 ili TLR6, prepoznaje acetilirane bakterijske lipoproteine, kao i bakterijsku lipoteikoičnu kiselinu. TLR5 primarno prepoznaje flagelin (Takeda i sur., 2003).

TLR9 sa svojim prepoznavanjem citozinsko-guaninskih parova u bakterijskoj DNA ima važnu ulogu u odgovoru na bolesti dišnih putova jer može mijenjati Th1/Th2 odgovor na antigene (Hemmi i sur., 2000).

TLR3, TLR7 i TLR8 važni su u odgovoru na virusne infekcije. TLR3 reagira na dvolančanu virusnu RNA (Alexopoulou i sur., 2001), a TLR7 i TLR8 na jednolančanu virusnu RNA (Heil i sur., 2004). TLR10 je posljednji otkriven i zasad nema poznatog liganda (Bezemer i sur., 2012).

Pretpostavlja se da TLR2 i TLR4 mogu prepoznati proteine toplinskog šoka Hsp60 i Hsp70 (HSP, engl. heat shock protein) koji vezanjem za receptore induciraju stvaranje upalnih citokina, kao i brojne druge molekule, primjerice, reaktivne kisikove spojevi (ROS, *engl*. reactive oxygen species), koji kao agonisti TLR2 receptora induciraju upalni odgovor, zatim proteine oslobođene iz mrtvih ili umirućih stanica te fragmente nastale kidanjem molekula

izvanstaničnog matriksa poput fibronektina i oligosaharida hijaluronske kiseline (Chen i sur., 2007).

1.3.3. Signalni put TLR receptora

Vezanje liganda inducira konformacijsku promjenu u TLR receptoru te dolazi do homodimerizacije ili heterodimerizacije TLR receptora. Većina TLR receptora se homodimerizira, dok TLR2 tvori heterodimere s TLR1 i TLR6 (Sarir i sur., 2008; Opitz i sur., 2010; Bezemer i sur., 2012).

Signalizacija ovisi o adaptacijskoj molekuli koja stupa u interakciju s unutarstaničnom TIR domenom (Akira, 2003). Četiri različite adaptacijske molekule mogu sudjelovati u signalizaciji koju potiču TLR receptori: čimbenik mijeloidne diferencijacije 88 (MyD88, engl. myeloid differentiation factor 88), koji također posreduje i u signalizaciji receptora za IL-1 (IL-1R, engl. interleukin-1 receptor), adaptacijski protein sličan MyD88/adaptacijski protein s TIR domenom (Mal/TIRAP, engl. MyD88 adaptor-like/TIR adaptor protein), adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (TRIF, engl. TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β) i adaptacijski protein srodan TRIF-u (TRAM, engl.TRIF-related adaptor molecule). Peta adaptacijska molekula, protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (SARM, *engl*. sterile-alpha and Armadillo motif containing protein), odgovorna je za negativnu regulaciju signalnog puta ovisnog o TRIF-u.

Svi do sada otkriveni TLR receptori, osim TLR3, nakon aktivacije koriste put ovisan o MyD88 adaptacijskoj molekuli koji dovodi do aktivacije jezgrinog čimbenika kappa B (NF-κB, engl. nuclear factor kappa B) i protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, engl. mitogen-activated protein kinase) signalnih putova. TLR3 koristi put neovisan o MyD88 (preko TRIF-a), a TLR4 oba puta, put ovisan i neovisan o MyD88 (Kawai i Akira, 2010)

U putu ovisnom o MyD88, MyD88 se povezuje s TIR domeom TLR receptora preko svoje TIR domene što dovodi do fosforilacije i aktivacije kinaza povezanih s receptorom za IL-1 (IRAK, engl. IL-1R associated kinases), ponajprije IRAK4, a zatim IRAK1. Za kompleks IRAK1/IRAK4 veže se čimbenik 6 povezan s TNF receptorom (TRAF6, engl. TNF-receptor-associated factor 6). To uzrokuje aktivaciju dvaju kinaza: kinaze koju aktivira transformirajući čimbenik rasta β (TAK1, engl. transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase) i kinaze 6 MAPK (MKK6, engl. mitogen-activated protein kinase kinase 6). Aktivirani TAK1 dovodi do fosforilacije inhibicijskog proteina kappa B (I-κB, engl. inhibitory kappa B). I-κB tada se otpušta iz kompleksa s NF-κB i degradira se putom proteasoma. NF-κB se pri tome aktivira i translocira u jezgru gdje djeluje kao transkripcijski

čimbenik i vezanjem za DNA potiče transkripciju gena za brojne antimikrobne proteine i upalne medijatore (pro-IL-1β, IL-6 i TNF-α). (Kawai i Akira, 2010; Opitz i sur., 2010)
MKK6 fosforilira MAPK te ih na taj način aktivira. Do sada je u sisavaca opisano 5 različitih skupina MAPK, od kojih su najvažnije kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1 i 2 (ERK 1/2, *engl*. extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), kinaze koje fosforiliraju N-kraj c-Jun-a (JNK, engl. c-Jun N-terminal kinases) i p38 kinaze. ERK1/2 se aktiviraju putom čimbenika rasta i povezuju se uglavnom s preživljavanjem stanice, proliferacijom i diferencijacijom. Aktivirani ERK1/2 fosforilira brojne transkipcijske čimbenike, primjerice c-Fos i aktivacijski protein 1 (AP-1, engl. activator protein 1), koji potiču transkripciju gena važnih za preživljavanje stanice. JNK i p38 kinaze se aktiviraju kao odgovor na stresne podražaje, poput osmotskog šoka, ionizirajućeg zračenja, oksidansa i citokina te su uglavnom odgovorni za poticanje upale i apoptoze. Aktivirane JNK i p38 kinaze fosforiliraju brojne transkipcijske čimbenike (c-Jun, NF-κB) koji vezanjem za DNA dovode do sinteze upalnih citokina i apoptoznih molekula. (Sarir i sur., 2008; Lu i Xi, 2006; Roux i Blenis, 2004)

1.3.4. Uloga TLR receptora u KOPB-u

TLR receptori imaju važnu ulogu u urođenom i stečenom imunosnom odgovoru. Njihova uloga je uglavnom u detekciji i odgovoru na mikrobiološku infekciju, ali su neki od njih uključeni u patogenezu autoimunih, kroničnih upalnih i zaraznih bolesti (Chen i sur., 2007).
Sve veći broj dokaza upućuje na to da oslabljeli urođeni imunitet pridonosi patogenezi KOPB-a (Lafferty i sur., 2010). Pojačana ekspresija TLR receptora u mnogim stanicama pluća, uključujući infiltrirajuće monocite i neutrofile koji su važni za patologiju bolesti, upućuje da aktivacija TLR receptora ima ulogu u razvoju KOPB-a (Chaudhuri i sur., 2005). Pretpostavlja se da se bolest razvija kao posljedica pretjerane aktivacije ili smanjene inhibicije TLR receptora (Liew i sur., 2005).
Veza između pušenja i KOPB-a također bi mogla biti posredovana TLR receptorima, naime TLR2, TLR4 i TLR9 su povezani s upalom izazvanom dimom cigareta, a TLR4 s produkcijom citokina izazvanom dimom cigareta (Bezemer i sur., 2012; Karimi i sur., 2006).
Izloženost dimu cigareta aktivira TLR4 u mišjim i ljudskim stanicama na način da sastojci dima cigareta izravno djeluju na TLR4 i aktiviraju ga ili djeluju neizravno uzrokujući oštećenje epitelnih stanica i otpuštanje DAMP molekula koje se onda vežu na TLR4 (Opitz i sur., 2010).
Istraživanja su pokazala da upala koju izazivaju oksidansi iz ekstrakta dima cigareta (CSE, *engl*. cigarette smoke extract) nije prisutna u *knockout* životinja za TLR2 i TLR4 te da TLR2

najvjerojatnije sudjeluje u ranoj fazi upale koju izazivaju oksidansi, dok bi TLR4 mogao biti uključen u kasnijoj fazi (Mitchell i sur., 2010).

U alveolarnim makrofagima bolesnika s KOPB-om i zdravih pušača opažena je snižena ekspresija TLR2 (Droemann i sur., 2005). U makrofagima monocitnoga porijekla kratkotrajno izlaganje dimu cigareta potisnulo je membransku ekspresiju TLR4 (Sarir i sur., 2009), a ekspresija TLR4 bila je snižena i u epitelnim stanicama nosa pušača i bolesnika s težim stadijima KOPB-a u odnosu na zdrave nepušače i bolesnike s blažim stadijima KOPB-a (MacRedmond i sur., 2007).

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

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

LTA i LPS, kao agonisti TLR2 i TLR4 receptora, izazivaju njihovu aktivaciju i pokretanje signalne kaskade koja rezultira upalnim odgovorom organizma.

LPS djeluje preko kompleksa koji uključuje TLR4, MD-2 i CD14 (stanični marker, *engl*. cluster of differentiation 14), a serumski protein koji veže LPS (LBP, *engl*. LPS biding protein) služi kao nosač LPS-a prema CD14. Zatim se pokreće MyD88 signalni put koji vodi aktivaciji brojnih protein-kinaza, odnosno o MyD88 neovisan signalni put preko TRIF adaptacijske molekule, što oboje rezultira transkripcijskom aktivacijom NF-κB (Mollen i sur., 2006).

Aktivacija monocita i makrofaga LPS-om stimulira otpuštanje matriksnih metaloproteinaza koje su vjerojatno važne u razvoju KOPB-a. Interakcije između monocita i glatkih mišićnih stanica mogu rezultirati otpuštanjem razgradnih produkta matriksa što će pridonijeti konstantnoj aktivaciji TLR4 receptora (Chaudhuri i sur., 2005). LPS povećava ekspresiju TLR4 u ljudskim neutrofilima i monocitima (Muzio i sur., 2000).

Dokazano je da se u dimu cigareta nalazi LPS (Hasday, 1999), kao i da duhan sadrži bakterije koje mogu biti izvori LPS-a (Pauly i sur., 2010). No, prema istraživanju iz 2006. smatra se da učinci dima cigareta na TLR receptore ne mogu biti pripisani LPS-u (Karimi i sur., 2006).

Slično LPS-u, LTA se veže za CD14 i preko TLR2 inducira aktivaciju transkripcijskog čimbenika NF-κB u makrofagima (Schröder i sur., 2003).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

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

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

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

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kultura stanica

THP-1 (American Type Culture Collection, SAD) su stanice akutne monocitne leukemije originalno izolirane iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta. Stanice su u suspenziji i rastu u manjim grudama (Tsuchiya i sur., 1980).

Stanice su uzgajane u bocama za uzgoj staničnih kultura (25 cm^2 ili 75 cm^2) s odgovarajućim volumenom RPMI 1640 medija s 10 % FBS-a i 1 % antibiotika i antimikotika, na 37 °C u atmosferi s 5 % CO_2.

Za pripremu medija koristi se 500 ml RPMI 1640 s L-glutaminom (Lonza Group Ltd, Švicarska) kojem su dodani 7 mM glukoza (Kemika), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich Co., SAD), 0,6 mM piruvat (Fluka, Švicarska), 10 % fetalni goveđi serum (inaktiviran toplinom; FBS, engl. fetal bovine serum) (South American Origin, Biosera, SAD) i 1 % koncentrirane otopine antibiotika i antimikotika (10000 U/ml penicilina, 10 mg/ml streptomicina, 25 µg/ml amfotericina B) (Lonza Group Ltd, Švicarska).

Stanice su kultivirane do 80 – 90 % konfluentnosti što je kontrolirano invertnim mikroskopom (Diavert, Leitz, Njemačka). Nakon postizanja tražene konfluentnosti, stanice su presađene ili tretirane određenim agensima.

3.1.1. Presađivanje stanica

Prilikom kultivacije, stanice su presađivane najčešće 2 puta tjedno. Kompletni RPMI medij iznad adherentnih stanica ukloni se vakuum sisaljkom.

Stanice se razrjeđuju na gustoću 0,2 – 0,4 x 10^6 stanica/ml na način da se uzme 1 – 2 ml stanica i 4 – 5 ml novog medija za uzgoj u boci od 25 cm^2, odnosno uzme 3 – 5 ml stanica i 10 – 12 ml novog medija za uzgoj u boci od 75 cm^2.

Brojanje stanica vrši se svakih 10 dana, tako da se stanice centrifugiraju (Biofuge Stratos Heraeus, Kendro Laboratory Products, Njemačka) 5 minuta na 200 g na sobnoj temperaturi, medij se odsiše vakuum sisaljkom te se stanice resuspendiraju u 1 ml medija za uzgoj stanica. Nakon toga se stanice izbroje u Neubauerovoj komorici s tripanskim plavilom, nakon čega im se u potpunosti promijeni medij, a volumen dodanog medija ovisi o željenoj gustoći stanica.

3.1.2. Tretiranje stanica

Stanice se nasade na ploče u određenom broju i volumenu. Inkubiraju se 24 sata na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2 , nakon čega se tretiraju s 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml i 5

μg/ml LPS-a (Sigma-Aldrich Co., SAD) te s 0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1 μg/ml i 5 μg/ml LTA (InvivoGen, Francuska) tijekom 24 sata. Kontrola su netretirane stanice.

3.2. Priprema staničnih lizata

Nakon tretiranja stanica, ploča sa 6 jažica stavi se na led te se medij iznad stanica premjesti u epruvete od 1,5 ml koje se centrifugiraju 10 minuta na 1500 g na +4 °C. Nakon centrifugiranja odvoji se nadsloj u nove epruvete za određivanje katalitičke aktivnosti LDH u mediju iznad stanica. Adherirane stanice u jažicama isperu se s 1 ml ledeno hladnog PBS-a, nakon čega se PBS ukloni vakuum sisaljkom.

PBS se priprema otapanjem 137 mM NaCl (Sigma-Aldrich Co., SAD), 2,7 mM KCl-a (Sigma-Aldrich Co., SAD), 4,3 mM Na_2HPO_4 x 7 H_2O (Kemika) i 1,4 mM KH_2PO_4 (Kemika) u ultračistoj vodi, nakon čega se dodaje HCl (Kemika) dok se ne postigne pH 7,4.

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

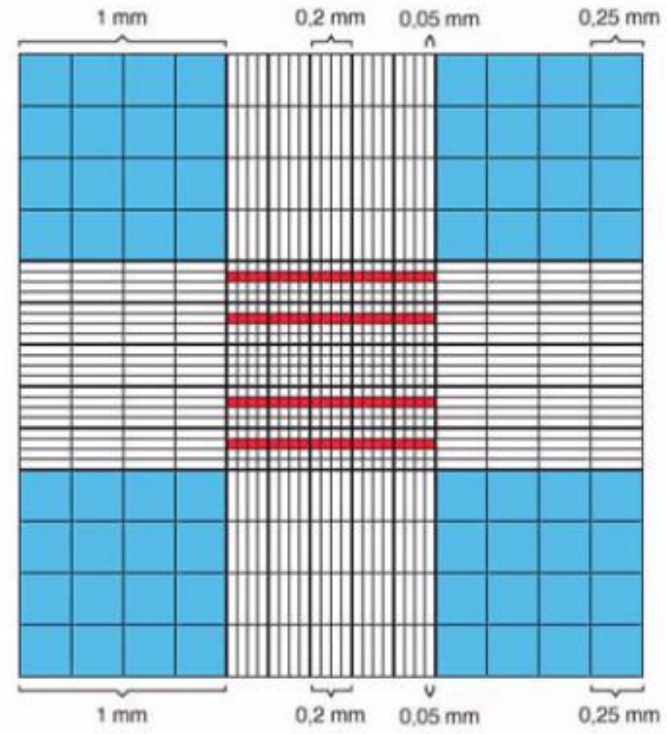
3.3. Test vijabilnosti i brojanje stanica tripanskim plavilom

Tijekom presađivanja stanica određuje se njihov broj i vijabilnost (udio živih stanica u ukupnom broju stanica) tako da se pomiješa 40 μl 0,4 %-tne boje tripansko plavilo (Lonza Group Ltd, Švicarska) i 10 μl suspenzije stanica. Moguća su različita razrjeđenja ovisno o željenoj gustoći stanica.

Ova metoda temelji se na principu da žive stanice imaju intaktne stanične membrane te stoga ne propuštaju boju tripansko plavilo u stanicu (molekule tripanskog plavila su velike i polarne), dok mrtve stanice propuštaju boju unutar stanice (molekule tripanskog plavila se u

stanici vežu na citoplazmatske proteine). Pod mikroskopom, žive stanice su neobojene, a mrtve su obojene plavo. (Strober, 2015.)

Kod pripreme za brojanja stanica, na Neubauerovu komoricu se nanese 10 µl mješavine tripanskog plavila i suspenzije stanica te se neobojene stanice izbroje pod invertnim mikroskopom (povećanje 400 x) unutar 3 – 5 minuta (slika 2).



Slika 2: Neubauerova komorica.

Stanice se broje u 4 velika kvadata (plavi kvadrati). Ukoliko su stanice na rubu kvadrata, broje se lijevi i gornji rub, uvijek isto za sve kvadrate. Da bi se dobio broj stanica/ml, srednja vrijednost broja stanica u 4 plava kvadrata množi se s 1000, uzimajući u obzir razrjeđenje (volumen plavog kvadrata je 0,1 µl).

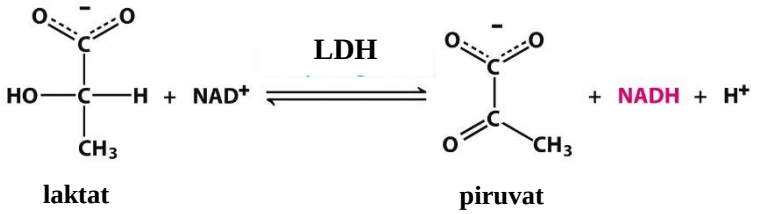
Mrtve stanice se ne trebaju uzimati u obzir kod brojanja za presađivanje, zamrzavanje ili za nasađivanje stanica za pokus.

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

$$\text{vijabilnost}\ (\%) = [\text{žive stanice} / (\text{žive} + \text{mrtve stanice})] \times 100$$

3.4. Određivanje katalitičke aktivnosti LDH

Određivanje katalitičke aktivnosti LDH služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari te se koristi kao pokazatelj integriteta stanične membrane. LDH je isključivo citoplazmatski enzim i ne bi smio biti prisutan u staničnom okolišu (mediju) ako je integritet stanične membrane očuvan. Princip metode prikazan je na slici 3.



Slika 3. Oksidacija laktata.
L-laktat se oksidira u piruvat u prisutnosti LDH, pri čemu se NAD+ reducira te se mjeri porast apsorbancije NADH na 340 nm na 37 °C prema destiliranoj vodi kao slijepoj probi (slika preuzeta od Berg, 2012).

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

$$\text{čimbenik} = (\text{TV} \times 1000) / (\text{SV} \times \varepsilon \times \text{P}),$$

pri čemu je TV ukupni volumen reakcijske smjese (µl), SV je volumen uzorka (µl), ε je milimolarni koeficijent apsorbancije NADH na 340 nm (6,3 L/mmol) i P je debljina kivete (cm). Pri našim uvjetima izračunat čimbenik je iznosio 4921.
Udio LDH koja se izluči u stanični medij se izračuna na sljedeći način:

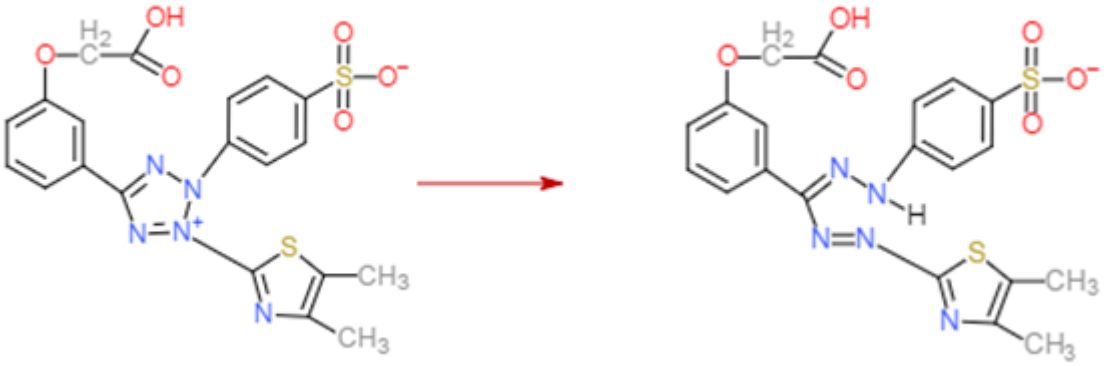
$$\text{udio LDH izlučene u medij (\%)} = \left[\frac{\text{katalitička aktivnost LDH u mediju iznad stanica (U/L)}/}{(\text{kat. akt. LDH u mediju iznad stanica(U/L)} + \text{kat. akt. LDH u staničnom lizatu (U/L)} \times \text{V})}\right]$$

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

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

3.5. MTS test

MTS test služi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u obojeni formazanski produkt (slika 4).
Nakon tretiranja stanica, u svaku jažicu se dodaje 20 µl MTS reagensa (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Wisconsin, SAD) bez prethodnog uklanjanja medija i stanice se inkubiraju tijekom 4 sata na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2.
Slijepa proba je kompletni RPMI medij. Apsorbancija se mjeri na 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (VICTOR3 Multilabel Reader, PerkinElmer, Massachusetts, SAD).
Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica proglasi se 100 %, a vrijednosti apsorbancija tretiranih uzoraka izraze se kao udio u odnosu na netretirane stanice. Rezultati se prikažu grafički kao srednja vrijednost vijabilnosti stanica ± standardna pogreška.



Slika 4. Prikaz redukcije MTS-a u formazan u živim stanicama.
Odvija se u metabolički aktivnim stanicama uz pomoć NADPH ili NADH koje stvaraju dehidrogenaze. Intenzitet boje nastao redukcijom MTS-a proporcionalan je broju živih stanica i određuje se spektrofotometrijski.
Izrađeno pomoću https://web.chemdoodle.com/demos/sketcher/.

3.6. Statistička obrada rezultata

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

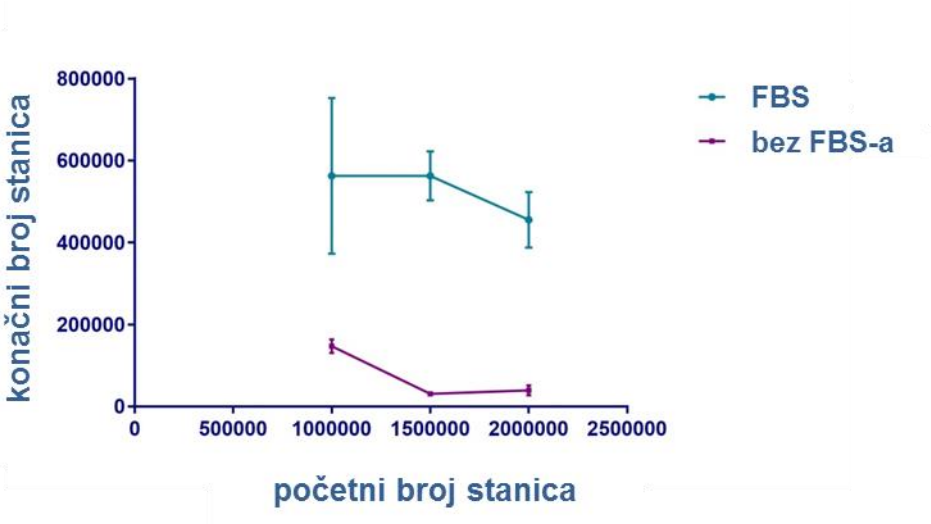
4.1. Određivanje optimalnog broja stanica i uvjeta kultiviranja za LDH test

Sljedećim pokusom želimo odrediti postoji li razlika u vijabilnosti stanica obzirom na njihov broj nasađen u jažici ploče s 6 jažica i obzirom na to jesu li tretirane 24 h u mediju bez seruma ili u mediju s 10 % FBS-a.

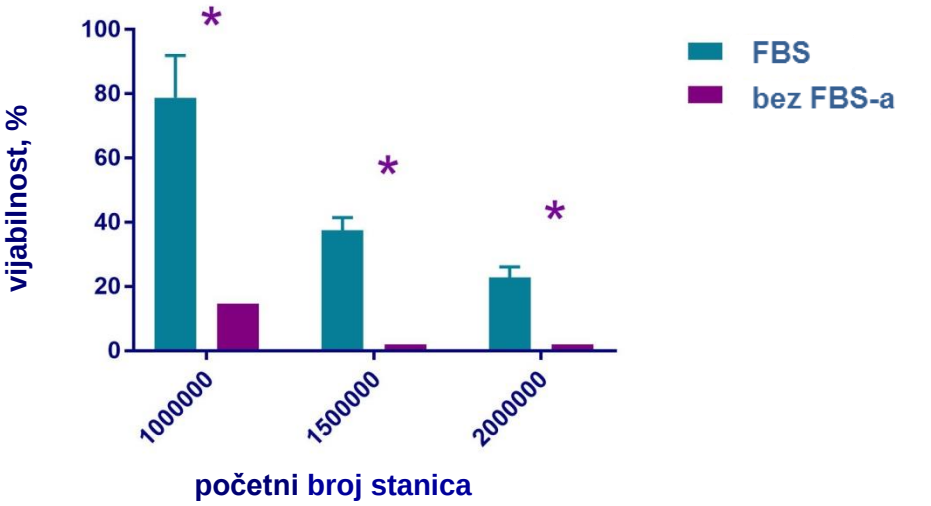
Kako bi se odredio optimalan broj stanica i uvjeti kultiviranja za LDH test na ploče sa 6 jažica nasadi se različiti broj THP-1 stanica: 1 x 10^6, 1,5 x 10^6 i 2 x 10^6. Stanice se inkubiraju 24 sata u RPMI mediju sa serumom na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Nakon toga se medij odsiše i u svaku jažicu se doda 1 ml medija sa serumom ili medija bez seruma. U takvim uvjetima stanice se kultiviraju tijekom 24 sata. Stanice se zatim izbroje pod invertnim mikroskopom na Neubauerovoj komorici uz dodatak tripanskog plavila te se odredi njihova vijabilnost. Rezultati se prikažu grafički kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

Na grafičkom prikazu (slika 5) vidi se da je u svim uzorcima došlo do pada broja stanica u odnosu na početni broj stanica. Konačan broj stanica bio je izrazito manji u uzorcima stanica koje su uzgajane u mediju bez dodatka seruma, dok su uzorci stanica uzgajani u mediju sa serumom pokazali sličan konačni broj stanica. Ipak, smanjenje konačnog broja stanica u odnosu na početni bilo je najmanje u uzorku gdje je početni broj stanica iznosio 1 x 10^6 te koje su uzgajane uz dodatak seruma.

U skladu s tim rezultatima su i podaci o vijabilnosti (slika 6). Vijabilnost je niska (<20 %) u uzorcima stanica uzgajanih bez dodatka seruma, a mrtve stanice uočene su i u uzorcima stanica uzgajanih uz dodatak seruma. Vijabilnost je najveća u uzorku s početnim brojem stanica 1 x 10^6 uzgajanih u mediju sa serumom (78,78 ± 13,25 %).



Slika 5. Ovisnost konačnog broja nasađenih THP-1 stanica o početnom broju stanica nakon 24 h kultiviranja u mediju s 10 % FBS-a i bez seruma. Broj stanica određen je tripanskim plavilom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=4. Značajnom razlikom u porastu broja stanica u mediju sa serumom u odnosu na medij bez seruma se smatrala vrijednost P<0,05 (*).



Slika 6. Vijabilnost THP-1 stanica nasađenih u različitom broju i kultiviranih 24 h u mediju s 10 % FBS-om i bez seruma određena tripanskim plavilom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti ± standardna pogreška, n=4. Uspoređivale su se vijabilnosti stanica nasađenih u jednakom broju u mediju sa serumom u odnosu na one u mediju bez seruma, a značajnom razlikom u vijabilnosti smatrala se vrijednost P<0,05 (*).

Ovo preliminarno ispitivanje služilo je kako bi se odredilo u kojem broju je optimalno nasađivati stanice na ploče sa 6 jažica te hoće li se prilikom kultivacije koristiti medij sa ili bez dodatka seruma. Prva 24 h nakon nasađivanja na ploču stanice su bile uzgajane u kompletnom RPMI mediju (sadrži 10 % FBS-a). Sljedeća 24 sata dio stanica je uzgajan u mediju sa serumom, a dio u mediju bez seruma. Brojanjem stanica tripanskim plavilom utvrđeno je da se broj stanica smanjio u svim uzorcima, a posebice u uzorcima stanica nasađenih u mediju bez seruma, te da je broj stanica najviši u uzorku s početnim brojem stanica 1 x 10^6 i uzgajanih u mediju sa serumom. Uzrok smanjenju broja stanica može biti količina medija (koristili smo 1 ml) koja nije dovoljna za održavanje više od 1 x 10^6 stanica. Takvi rezultati su u skladu s preporukom ATCC-a za uzgoj THP-1 stanica u RPMI mediju uz dodatak 10 % FBS-a, gdje koncentracija stanica ne smije prelaziti 1 x 10^6/ml (www.lgcstandards-atcc.org).

Temeljem ovog ispitivanja odlučili smo da ćemo za daljnje pokuse nasađivati 1 x 10^6 stanica u 1 ml medija sa serumom budući da je u tim uvjetima pad broja stanica bio najmanji.

4.2. Utjecaj načina pripreme staničnih lizata na katalitičku aktivnost LDH

Ispitivalo se kako će priprema staničnih lizata (uz dodatno soniciranje ili bez njega) utjecati na katalitičku aktivnost laktat dehidrogenaze lizata THP-1 stanica. Stanice su nasađene na ploče sa 6 jažica tako da ih je bilo 1 x 10^6 u 1 ml kompletnog RPMI medija i inkubirane su 24 sata. Nakon toga su se pripremili stanični lizati na dva načina: uz dodatno soniciranje upotrebom ultrazvučnog homogenizatora ili bez dodatnog soniciranja te se određivala katalitička aktivnost LDH. Uspoređivale su se vrijednosti aktivnosti LDH lizata netretiranih stanica dobivenih bez i sa soniciranjem, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=4.

Vrijednosti katalitičke aktivnosti LDH značajno su se razlikovale u uzorcima staničnih lizata uz dodatno soniciranje (288 ± 7 U/L) u odnosu na lizate pripremljene bez soniciranja (254,4 ± 3 U/L), $P<0,05$.

Ovim preliminarnim ispitivanjem određivalo se kakav utjecaj ima dodatno soniciranje na pripremu staničnih lizata kako bi se optimirali uvjeti ispitivanja vijabilnosti THP-1 stanica mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH. Iako je naše ispitivanje pokazalo da dodatno soniciranje ima utjecaja na katalitičku aktivnost LDH kod pripreme staničnih lizata, u daljnjim ispitivanjima koristili smo postupak bez soniciranja radi optimizacije vremenskog trajanja cijelog eksperimenta.

4.3. Utjecaj temperature, stajanja uzorka i inhibitora proteaza na aktivnost LDH

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

4 °C	1. dan	2. dan	3. dan	5. dan
netretirane stanice, medij	24,0 ± 2,0	17,0 ± 2,0	19,5 ± 1,5	15,5 ± 1,5
netretirane stanice, lizat s tabletom inhibitora proteaza	348,0 ± 4,0	315,0 ± 3,0	270,0 ± 6,0	271,0 ± 1,0
netretirane stanice, lizat bez tablete inhibitora proteaza	338,0 ± 6,0	340,0 ± 0,0	330,0 ± 8,0	352,0 ± 6,0
-20 °C	**1. dan**	**2. dan**	**3. dan**	**5. dan**
netretirane stanice, medij	24,0 ± 2,0	13,0 ± 1,0	20,0 ± 2,0	13,5 ± 0,5
netretirane stanice, lizat s tabletom inhibitora proteaza	348,0 ± 4,0	318,0 ± 2,0	211,0 ± 1,0	223,0 ± 1,0
netretirane stanice, lizat bez tablete inhibitora proteaza	338,0 ± 6,0	310,0 ± 0,0	212,0 ± 8,0	219,0 ± 1,0

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

Ovim preliminarnim ispitivanjem određivao se utjecaj temperature, vremena čuvanja uzoraka na određenoj temperaturi te dodatka tablete inhibitora proteaza (kod staničnih lizata) na katalitičku aktivnost LDH. Ispitivanje je pokazalo da nema razlike u aktivnosti LDH u mediju iznad stanica ukoliko se određivanje provodilo isti dan i nakon čuvanja uzorka dva, tri ili pet dana na +4 °C, dok se kod čuvanja na -20 °C rezultati razlikuju u odnosu na rezultate prvog dana. Ispitivanje je također pokazalo da inhibitor proteaza ne uzrokuje značajno smanjenje katalitičke aktivnosti LDH određivane odmah nakon pripreme staničnih lizata u uzorcima lizata čuvanih na +4 °C i -20 °C, kao ni kod uzoraka čuvanih na 20 °C kada je mjerenje provedeno drugi, treći i peti dan. Kod uzoraka čuvanih na 4 °C, mjerenih drugi, treći i četvrti dan, razlika izmjerene katalitičke aktivnosti bila je značajno smanjena u uzorcima s dodatkom inhibitora proteaza. Temeljem rezultata dobivenih ovim ispitivanjem zaključeno je da LDH nije nužno određivati isti dan nakon pripreme staničnih lizata. Ipak, obzirom da se ovaj

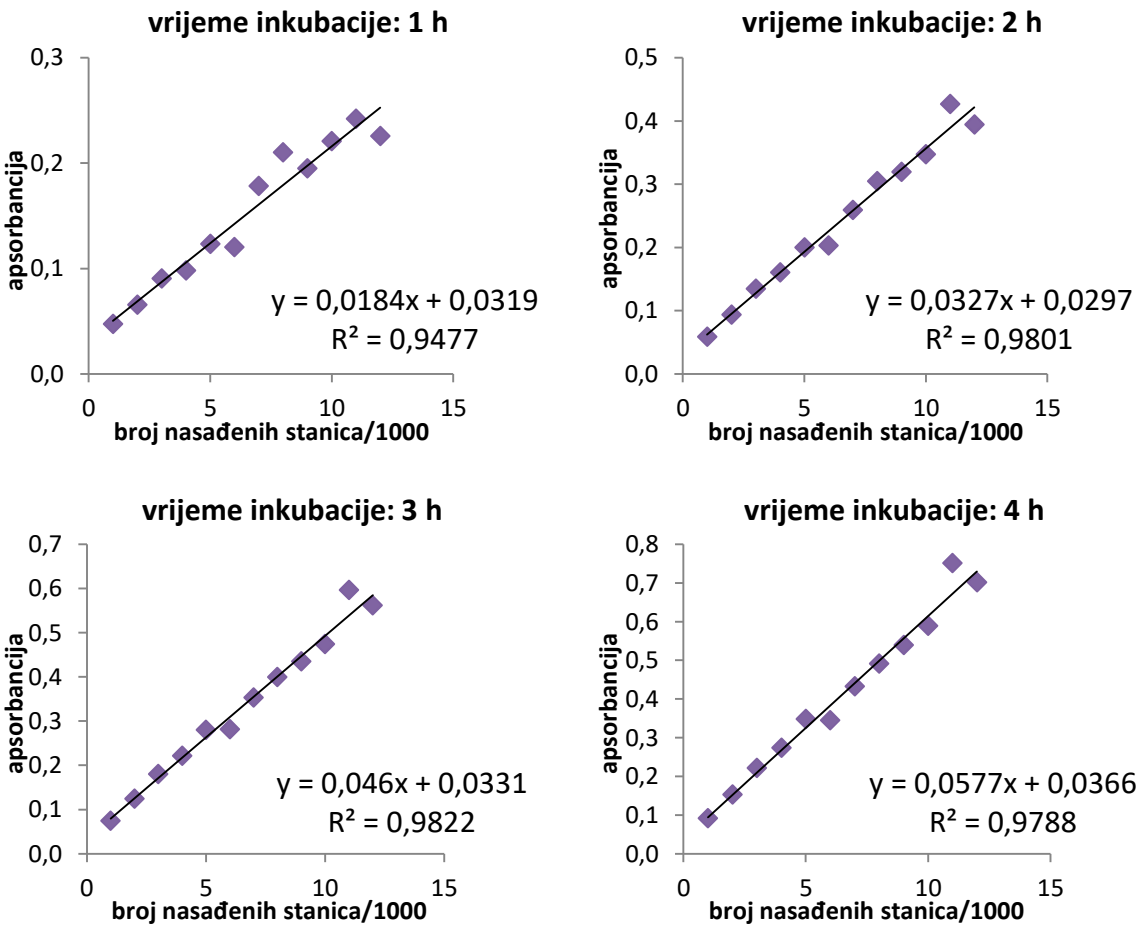
zaključak temelji na samo dva mjerenja po svakom navedenom uvjetu (n=2), rezultate bi trebalo provjeriti na većem broju uzoraka. Osim toga, stanični lizati pripremljeni na ovakav način koriste se i za neke druge analize za koje je važna prisutnost inhibitora proteaza te je stoga odlučeno da će se inhibitor proteaza dodavati u lizirajući pufer.

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

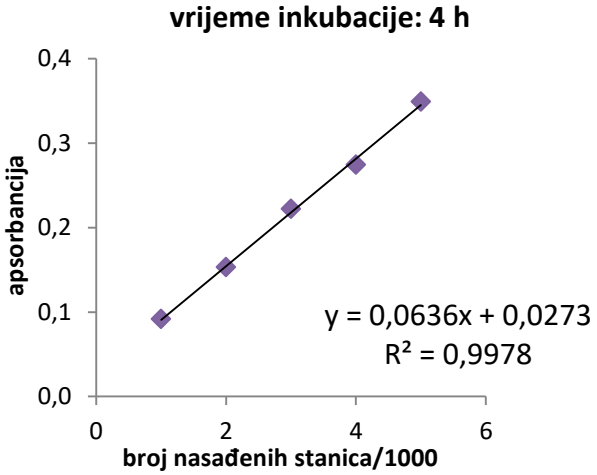
Kako bi se odredio optimalan broj stanica i vrijeme inkubacije za MTS test, na ploče s 96 jažica nasadi se različit broj THP-1 stanica: od 1 x 10^3 do 12 x 10^3 stanica/ml RPMI medija sa serumom. Stanice se inkubiraju 24 sata na 37 °C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO_2. Nakon toga se medij odsiše i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

Rezultati su pokazali vrlo visoku pozitivnu matematičku korelaciju uz razinu vjerojatnosti $P<0,0001$. Stanice inkubirane 1 h nakon dodatka MTS reagensa pokazale su najmanju korelaciju (R^2=0,9477), one inkubirane 4 h veću (R^2=0,9788), zatim inkubirane 2 h još veću (R^2=0,9801), dok su one inkubirane 3 h pokazale najveću korelaciju (R^2=0,9822). Iz dobivenih jednadžbi pravaca vidjelo se da je nagib najveći nakon 4 h inkubacije (a=0,0577), te se smanjuje kako se vrijeme inkubacije skraćuje (a=0,046 za 3 h, a=0,0327 za 2 h i a=0,0184 za 1 h) (slika 7).

Na slici 4.4. može se vidjeti da je linearno područje za stanice inkubirane 4 h nakon dodatka MTS reagensa između 1 x 10^3 i 5 x 10^3 nasađenih stanica po jažici (R^2=0,9978).



Slika 7. Ovisnost apsorbancije na 490 nm o broju nasađenih THP-1 stanica određena MTS testom nakon inkubacije 1, 2, 3 i 4 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=5.



Slika 8. Ovisnost apsorbancije na 490 nm o broju nasađenih THP-1 stanica, za od 1 x 10^3 do 5 x 10^3 nasađenih stanica, određena MTS testom nakon inkubacije 4 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=5.

Ovim preliminarnim ispitivanjem određivalo se u kojem broju nasaditi stanice na ploče s 96 jažica te koliko dugo će se inkubirati stanice nakon dodatka MTS reagensa s obzirom na linearni odnos apsorbancije i broja nasađenih stanica. Budući da stanice inkubirane 4 sata i stanice inkubirane 3 sata nakon dodatka MTS reagensa imaju slične koeficijente korelacije uspoređivali smo njihove nagibe pravaca. Uočeno je da stanice inkubirane 4 h imaju najveći nagib pravca, odnosno za manju promjenu broja stanica imamo veću promjenu apsorbancije, te je odlučeno da će se stanice inkubirati upravo 4 sata nakon dodatka reagensa. Nakon toga smo odredili područje najveće linearnosti (R^2=0,9978) za stanice inkubirane 4 sata (slika 8) koje se nalazi u području od 1 x 10^3 do 5 x 10^3 nasađenih stanica po jažici te smo odlučili da će se za MTS test nasađivati 5 x 10^3 stanica jer je pri toj vrijednosti apsorbancija dovoljno visoka. To se slaže s preporukom protokola korištenog MTS reagensa prema kojem se optimalni rezultati dobivaju kada se u jažicu nasadi 5 x 10^3 stanica (vrijedi za većinu tumorskih stanica) iako se vijabilnost može odrediti i ako nasadimo manje stanica (minimalno 1 x 10^3) (www.promega.com).

4.5. Utjecaj LTA i LPS-a na vijabilnost THP-1 stanica

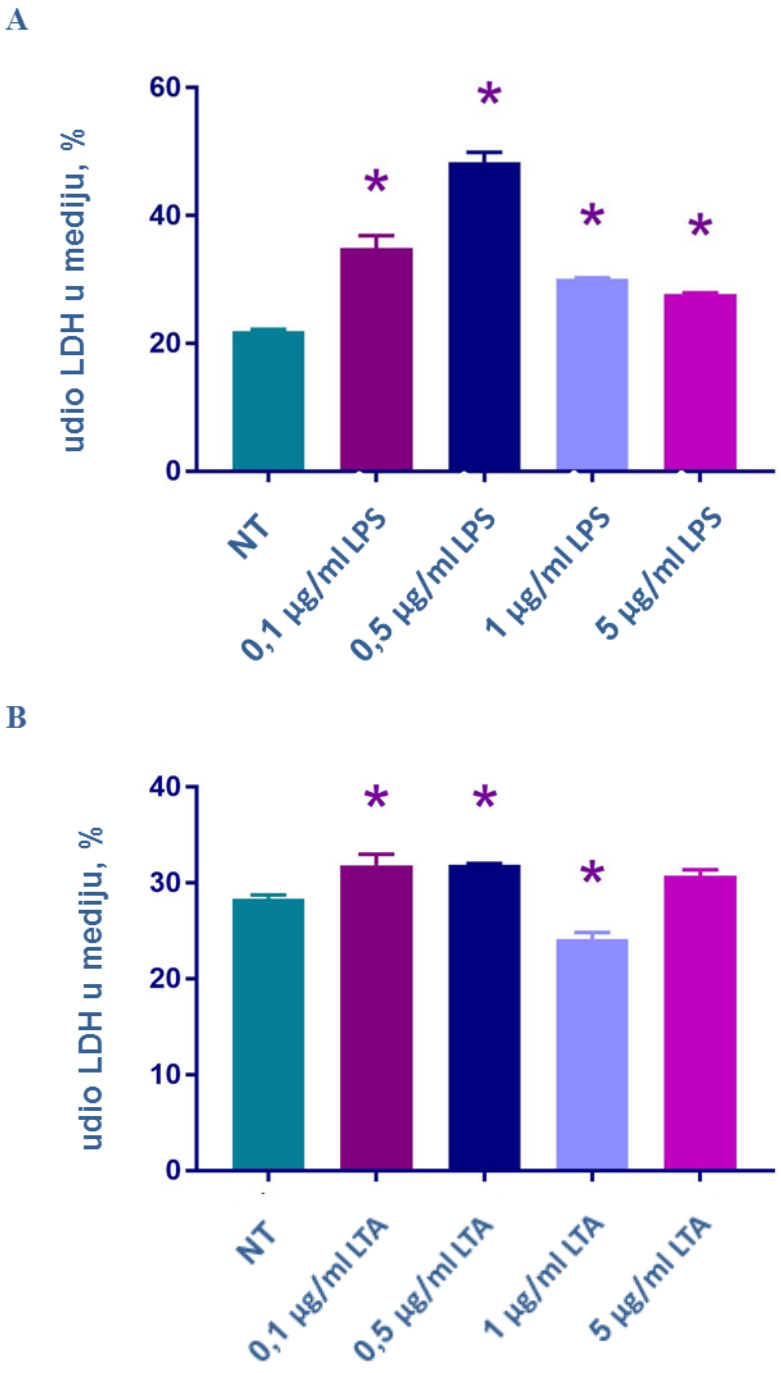
4.5.1. Određivanje vijabilnosti mjerenjem katalitičke aktivnosti LDH

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

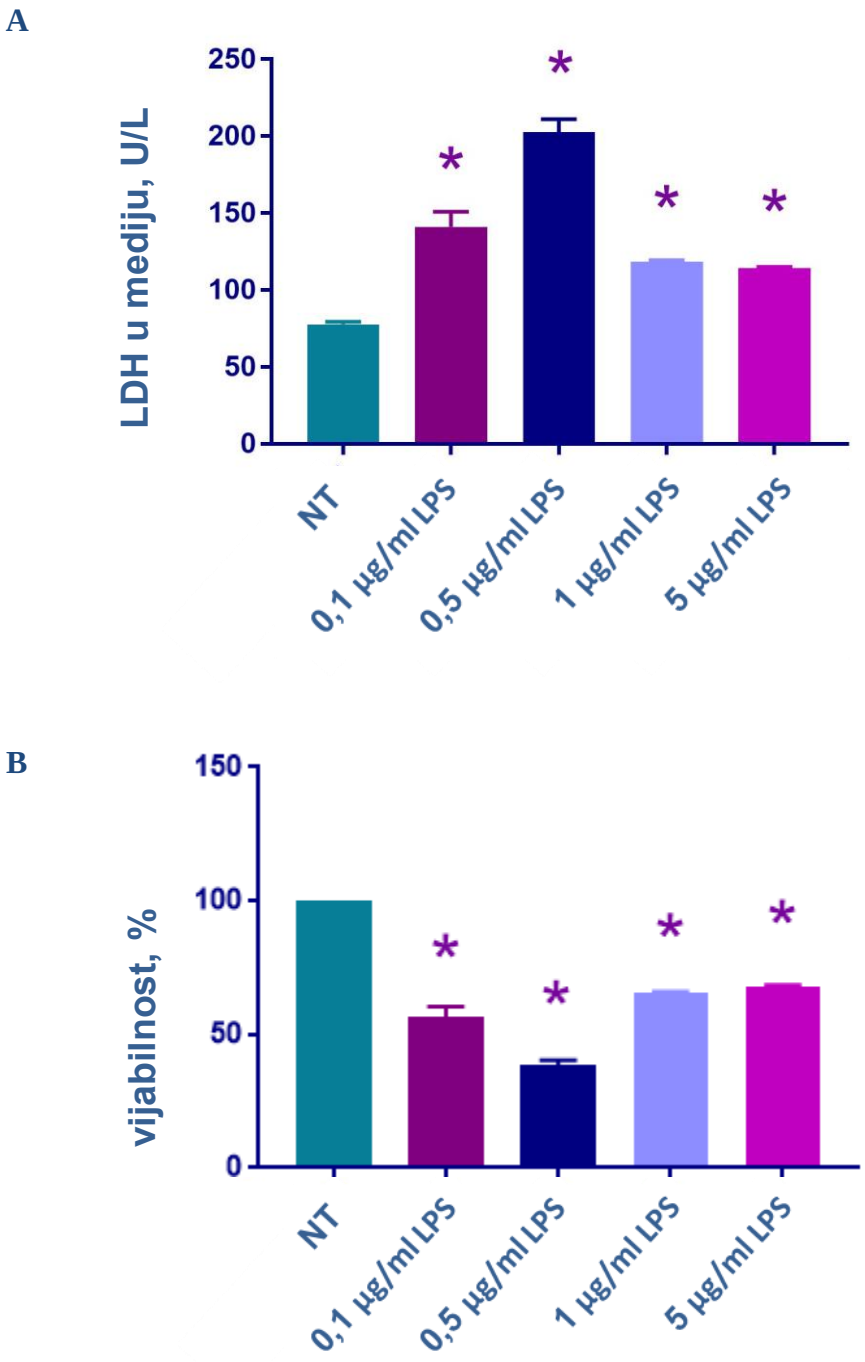
Rezultati određivanja udjela LDH izlučene u medij u odnosu na ukupnu LDH u stanicama pokazali su da sve korištene koncentracije LPS-a dovode do značajnog porasta udjela LDH u mediju (34,91 ± 1,95 %, 48,31 ± 1,60 %, 30,10 ± 0,15 %, 27,78 ± 0,16 %) u odnosu na netretirane stanice (21,91 ± 0,32 %). Također, do značajne promjene udjela LDH u mediju dolazi kada stanice tretiramo s 0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml i 1 μg/ml LTA (31,87 ± 1,16 %, 31,88 ± 0,16 %, 24,16 ± 0,70 %) u odnosu na netretirane stanice (28,39 ± 0,36 %). LTA u svim korištenim koncentracijama izaziva porast udjela LDH izlučene u medij u odnosu na ukupnu LDH u stanicama, osim kod koncentracije 5 μg/ml (slika 9).

Rezultati određivanja izlučene LDH u medij nakon tretiranja stanica LPS-om pokazali su da sve korištene koncentracije LPS-a (0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1 μg/ml i 5 μg/ml) značajno povećavaju količinu LDH u mediju u odnosu na netretirane stanice, s time da je najveći porast zabilježen kod 0,5 μg/ml LPS-a. U skladu s tim, vidimo smanjenje vijabilnosti u svim uzorcima (redom 56,49 ± 3,92 %, 38,70 ± 1,59 %, 65,61 ± 0,47 % i 68,09 ± 0,50 %) (slika 10).

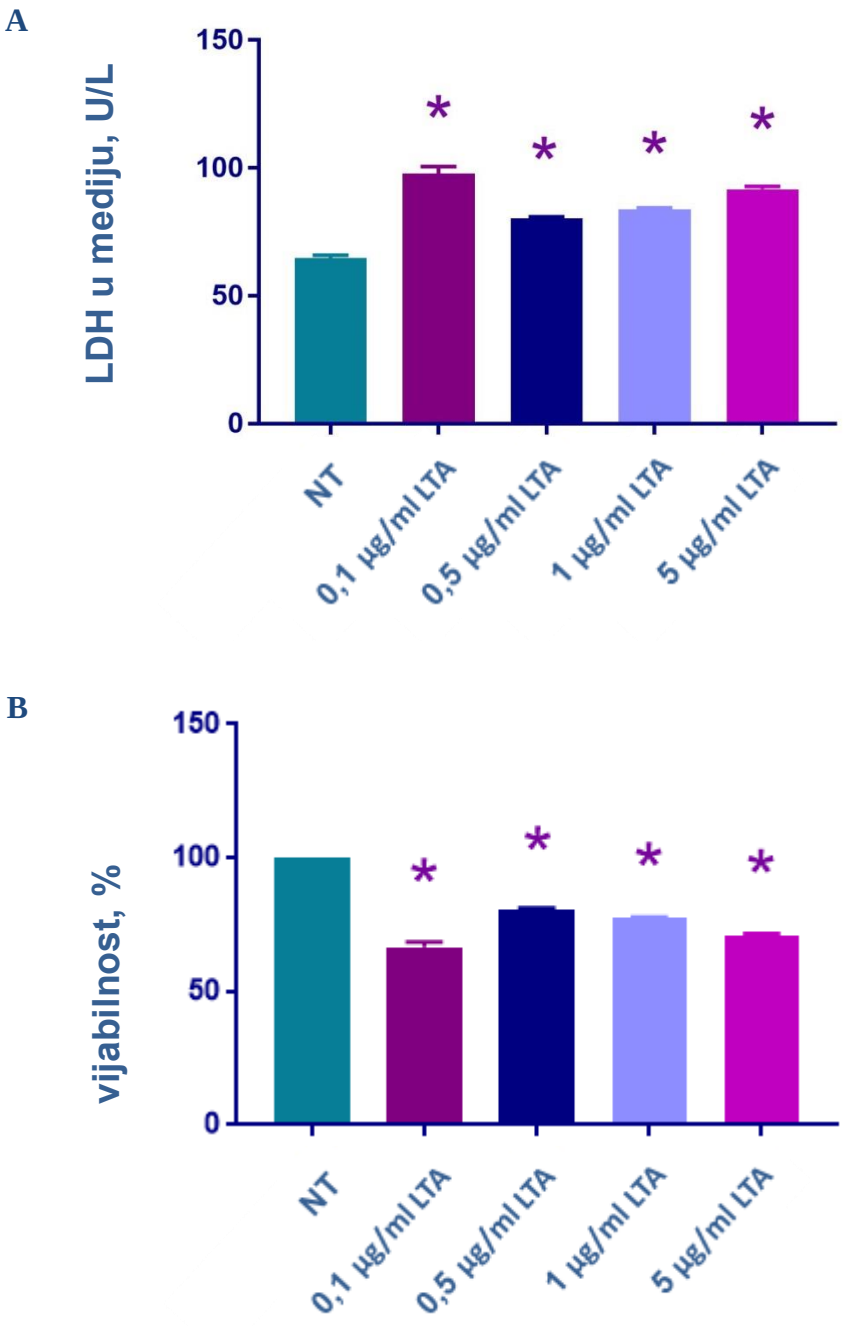
Rezultati određivanja izlučene LDH u medij nakon tretiranja stanica s LTA pokazali su da sve korištene koncentracije LTA (0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1 μg/ml i 5 μg/ml) značajno povećavaju količinu LDH u mediju u odnosu na netretirane stanice, s time da je najveći porast zabilježen kod 0,1 μg/ml LTA. U skladu s tim, vidimo smanjenje vijabilnosti u svim uzorcima (redom 66,55 ± 1,96 %, 80,73 ± 0,62 %, 77,36 ± 0,57 %, 70,78 ± 0,89 %) (slika 11).



Slika 9. Udio LDH izlučene u medij u odnosu na ukupnu LDH (LDH u mediju i staničnom lizatu) THP-1 stanica nakon 24 h tretiranja LPS-om (A) i LTA (B). NT su netretirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=6. Značajno različitim udjelom LDH u mediju u odnosu na netretirane stanice smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).



Slika 10. Izlučeni LDH u medij iznad THP-1 stanica (A) i vijabilnost stanica (B) nakon 24 h tretiranja LPS-om. Vijabilnost je izračunata prema udjelu izlučenog LDH u medij prema srednjoj vrijednosti kontrole (NT) za koju se uzelo da iznosi 100 %. NT su netretirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=6. Značajnom razlikom izlučenog LDH i vijabilnosti u odnosu na netretirane stanice smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).

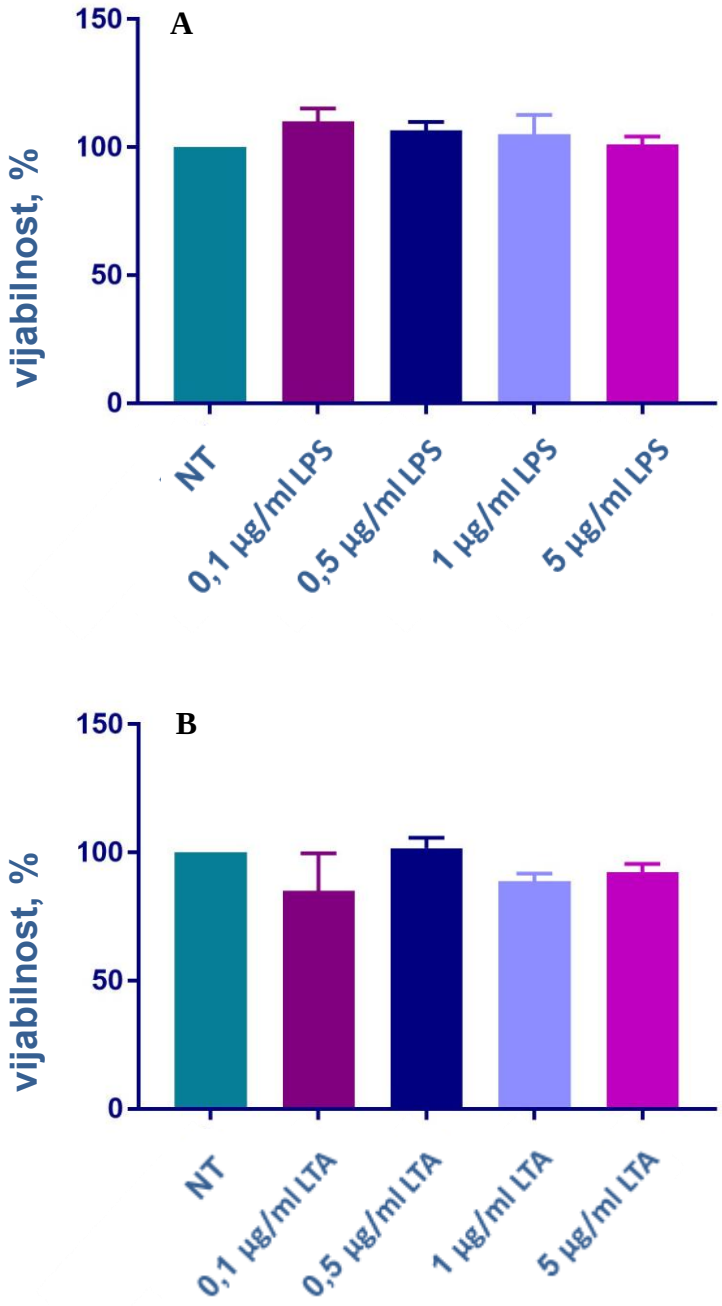


Slika 11. Izlučeni LDH u medij iznad THP-1 stanica (A) i vijabilnost stanica (B) nakon 24 h tretiranja s LTA. Vijabilnost je izračunata prema udjelu izlučenog LDH u medij prema srednjoj vrijednosti kontrole (NT) za koju se uzelo da iznosi 100 %. NT su netretirane stanice. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, n=6. Značajnom razlikom izlučenog LDH i vijabilnosti u odnosu na netretirane stanice smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).

4.5.2. Određivanje vijabilnosti MTS testom

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

Rezultati su pokazali da dolazi do povišenja vijabilnosti tretiranjem stanica LPS-om, no ta se promjena ne može smatrati statistički značajnom u odnosu na kontrolu, $P>0,05$. Kod tretiranja stanica s LTA također nije uočena statistički značajna promjena vijabilnosti u odnosu na netretirane stanice, $P>0,05$ (slika 12).



Slika 12. Vijabilnost THP-1 stanica nakon tretiranja LPS-om (A) i s LTA (B) određena MTS testom. Vijabilnost je izračunata prema srednjoj vrijednosti apsorbancija kontrole (NT) za koju se uzelo da iznosi 100 %. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost vijabilnosti ± standardna pogreška, n=5. Uspoređivale su se vijabilnosti tretiranih uzoraka s kontrolom, a značajno različitom vijabilnosti u odnosu na kontrolu smatrala se vrijednost $P<0,05$ (*).

U ovom ispitivanju korišteni su LPS i LTA, agonisti TLR4 i TLR2 receptora, koji vezanjem za receptore dovode do aktivacije NF-κB i MAPK signalnih putova te posljedično do upalnog odgovora, kako bi se pokušala imitirati upala prisutna u bolesnika s KOPB-om. Djelovanje 4 različite koncentracije LPS-a i LTA (0,1, 0,5, 1 i 5 μg/ml) tijekom 24 h na THP-1 stanice ispitivalo se dvama testovima vijabilnosti: određivanjem katalitičke aktivnosti LDH i MTS testom.

LDH je enzim koji se zbog svoje veličine (Mr=140 kDa) u zdravim stanicama nalazi isključivo u citoplazmi. Uslijed gubitka integriteta stanične membrane izlazi u stanični okoliš te se određivanjem katalitičke aktivnosti LDH u mediju iznad stanica može odrediti utjecaj različitih agenasa na integritet stanične membrane. MTS testom određuje se metabolička aktivnost, odnosno redukcijska sposobnost stanice (redukcija MTS-a u formazan).

Određivanjem udjela LDH u mediju iznad stanica u odnosu na ukupni LDH u stanicama pokazalo se da tretiranje THP-1 stanica LPS-om u koncentracijama 0,1, 0,5, 1 i 5 μg/ml dovodi do smanjenja integriteta stanične membrane.

Ispitivanje Koff-a i suradnika provedeno na NCI-H292 stanicama, a u kojem se također određivao udio LDH izlučen u medij, pokazalo je da tek koncentracije ≥300 μg/ml uzrokuju gubitak integriteta stanične membrane. Isto ispitivanje je pokazalo da LPS u koncentracijama od 10 i 100 μg/ml ne utječe na integritet stanične membrane (Koff i sur., 2006). Sličnim ispitivanjem LDH provedenom na BEAS-2B epitelnim stanicama humanog bronhijalnog epitela tretiranih tijekom 24 h s 0,1, 1 i 10 μg/ml LPS-a pokazalo se da nema razlike u promjeni integriteta stanične membrane nakon tretiranja stanica (izraženo kao vijabilnosti) (Verspohl i Podlogar, 2012). Kako ne postoji slično istraživanje provedeno na THP-1 stanicama gdje se vijabilnost određivala prema izlučenoj LDH, potencijalni razlog nepodudaranja rezultata može biti u većoj osjetljivosti THP-1 stanica u usporedbi s NCI-H292 stanicama i BEAS-2B stanicama.

Rezultati dobiveni MTS testom pokazali su da nema značajne promjene vijabilnosti nakon tretiranja stanica LPS-om, niti LTA. Ispitivanje vijabilnosti MTS testom na THP-1 stanicama humane monocitne stanične linije nakon tretiranja s 1, 5, 10 i 20 μg/ml LPS-a tijekom 24 h pokazalo je da koncentracije ≥10 μg/ml LPS-a dovode do smanjenja redukcijske sposobnosti stanica, dok niže koncentracije ne utječu na staničnu metaboličku aktivnost (Huang i sur., 2012). Takvi zaključci su u skladu s našim rezultatima.

Rezultati ostalih istraživanja razlikuju se ovisno o tipu stanice. MTS testom na A549 stanicama nakon 24 h tretiranja s 0,1, 1 i 10 μg/ml LPS-a pokazalo se da navedene koncentracije dovode do povećanja proliferacije stanica (Hattar i sur., 2012). Međutim,

BEAS-2B stanice za iste koncentracije LPS-a nisu pokazale promjenu redukcijske sposobnosti stanica (Verspohl i Podlogar, 2012).

Ispitivanje vijabilnosti THP-1 stanica određivanjem katalitičke aktivnosti LDH nakon tretiranja s LTA pokazalo je da LTA u koncentracijama 0,1, 0,5, 1 i 5 μg/ml izaziva smanjenje integriteta stanične membrane. Nema podataka o sličnom ispitivanju, no ispitivanje imunosnog odgovora na LPS i LTA na goveđim mliječnim žlijezdama pokazalo je da do povećanog oslobađanja LDH u okolni medij dolazi s LPS-om (0,2 μg/ml) i LTA (20 μg/ml), te da je odgovor nešto jači kad se primjenjuje LPS. (Wellnitz i sur., 2011)

MTS testom na A549 stanicama je pokazano da tretiranje s 10, 30 i 50 μg/ml LTA tijekom 24 sata ne utječe na metaboličku aktivnost stanica (Liu i sur., 2012). Slično tome, ispitivanje MTS testom nakon 24 sata tretiranja dermalnih fibroblasta s 1, 5, 20, 50, 100 i 200 μg/ml LTA je pokazalo da jedino 200 μg/ml LTA smanjuje redukcijsku sposobnost stanica (Choi, 2010). Naše istraživanje je u skladu s prethodno navedenima. Naime, MTS testom pokazalo se da tretiranjem THP-1 stanica s 0,1, 0,5, 1, 5 μg/ml LTA tijekom 24 sata ne dolazi do promjena u staničnoj metaboličkoj aktivnosti.

5. ZAKLJUČCI

1. Optimalan broj THP-1 stanica na pločama sa 6 jažica postiže se nasađivanjem 1 x 10^6 stanica/ml RPMI medija s 10 % FBS-a.

2. THP-1 stanice pokazale su izrazito nisku vijabilnost u uvjetima uzgoja bez dodatka seruma, a vijabilnost je bila najveća kod početnog broja stanica od 1 x 10^6 stanica/ml RPMI medija s 10 % FBS-a.

3. Priprema staničnih lizata THP-1 stanica puferom za lizu uz dodatno soniciranje ima utjecaja na katalitičku aktivnost LDH u odnosu na lizate pripremljene bez dodatnog soniciranja, no taj postupak nismo provodili radi vremenske optimizacije eksperimenta.

4. Katalitička aktivnosti LDH u mediju iznad THP-1 stanica ne mijenja se značajno s duljim čuvanjem uzorka (dva, tri ili pet dana) na +4 °C.

5. Dodatak tablete inhibitora proteaza u pufer za lizu stanica ne uzrokuje značajno smanjenje katalitičke aktivnosti LDH kada se ona određuje odmah nakon pripreme staničnih lizata u uzorcima lizata čuvanih na +4 °C i -20 °C. Također, smanjenje aktivnosti ne uočavamo ni kod uzoraka čuvanih na 20 °C kada je mjerenje provedeno drugi, treći i peti dan. Kod uzoraka čuvanih na 4 °C, mjerenih drugi, treći i četvrti dan, razlika izmjerene katalitičke aktivnosti bila je značajno smanjena u uzorcima s dodatkom inhibitora proteaza.

6. Optimizacija uvjeta za MTS test je pokazala da je na ploče s 96 jažica najbolje nasaditi 5 x 10^3 THP-1 stanica/100 µl medija s 10 % FBS-a te da inkubacija nakon dodatka MTS reagensa mora trajati 4 sata.

7. LDH test je pokazao da u THP-1 stanicama sve korištene koncentracije lipopolisaharida (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml i 5 µg/ml) utječu na integritet stanične membrane te značajno povećavaju propusnost membrane.

8. LDH test je pokazao da u THP-1 stanicama sve korištene koncentracije lipoteikoične kiseline (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml i 5 µg/ml) utječu na integritet stanične membrane te značajno povećavaju propusnost membrane.

9. Prema rezultatima MTS testa niti lipopolisaharid niti lipoteikoična kiselina u korištenim koncentracijama značajno ne utječu na metaboličku aktivnost THP-1 stanica.

6. LITERATURA

Adeloye D, Chua S, Lee C, Basquill C, Papana A, Theodoratou E, Nair H, Gasevic D, Sridhar D, Campbell H, Chan KY, Sheikh A, Rudan I, and Global Health Epidemiology Reference Group. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta–analysis. *J Glob Health*, 2015, 5, 020415. (Objavljeno online.)

Akira S. Toll-like Receptor Signaling. *J Biol Chem*, 2003, 40, 38105-38108.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 2001, 413, 732–738.

Assad NA, Balmes J, Cheema U, Mehta S, Sood A. Chronic obstructive pulmonary disease secondary to household air pollution. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015, 36, 408-421.

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

Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 1, 16-27.

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

Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E, and BOLD Collaborative Research Group. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*, 2007, 9589, 741-750.

CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay techincal bulletin (Instructions for use of products G3580, G3581 AND G3582), 2012, www.promega.com, pristupljeno 10.4.2017.

Chaudhuri N, Dower Steven K, Whyt Moira KB. Toll-like receptors and chronic lung disease. *Clin Sci*, 2005, 2, 125-133.

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

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

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). 2016., www.who.int, pristupljeno 20.3.2016.

de Marco R, Accordini S, Marcon A, Cerveri I, Antó JM, Gislason T, Heinrich J, Janson C, Jarvis D, Kuenzli N, Leynaert B, Sunyer J, Svanes C, Wjst M, Burney P; European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a European Cohort of Young Adults. *Am J Resp Crit Care*, 2010, 183, 891-897.

Domej W, Oettl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD – implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2014, 9, 1207-1224.

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

The economic burden of lung disease, 2017, http://www.erswhitebook.org/, pristupljeno 10.4.2017.

Global Initiative for Chronic Opstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD (Updated 2017.). 2017, www.goldcopd.org, pristupljeno 10.4.2017.

Guarascio AJ, Ray SM, Finch CK, Self TH. The clinical and economic burden of chronic obstructive pulmonary disease in the USA. *Clinicoecon Outcomes Res*, 2013, 5, 235-245.

Guerra S, Sherrill DL, Venker C, Ceccato CM, Halonen M, Martinez FD. Chronic Bronchitis Before Age 50 Years Predicts Incident Airflow Limitation and Mortality Risk. *Thorax*, 2009, 64, 894-900.

Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. .] Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*, 2006, 28, 523-532.

Hattar K, Savai R, Subtil FS,Wilhelm J, Schmall A, Lang DS, Goldmann T, Eul B, Dahlem G, Fink L, Schermuly RT, Banat GA, Sibelius U, Grimminger F, Vollmer E, Seeger W,

Grandel U. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62, 309–320.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004, 303, 1526–1529.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, 408, 740-745.

Hoog JC, Timen W. The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Pathol-Mech*, 2004, 4, 435-459.

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

Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, Sano H, Konishi M, Akino T, Kuroki Y. The Extracellular Toll-like Receptor 2 Domain Directly Binds Peptidoglycan Derived from Staphylococcus aureus. *J Biol Chem*, 2002, 277, 24315-24320.

Johnson SR. Untangling the protease web in COPD: metalloproteinases in the silent zone. Thorax, 2016, 71, 105-106.

Karimi K, Sarir H, Mortaz E, Smit JJ, Hosseini H, De Kimpe SJ, Nijkamp FP, Folkerts G. Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages. Nat Immunol, 2006, 7, 66.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol, 2010, 11, 373–384.

Kim V, Crapo J, Zhao H, Jones PW, Silverman EK, Comellas A, Make BJ, Criner GJ, COPDGene Investigators. Comparison between an Alternative and the Classic Definition of Chronic Bronchitis in COPDGene. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12, 332-339.

Kim V, Han MK, Vance GB, Make BJ, Newell JD, Hokanson JE, Hersh CP, Stinson D, Silverman EK, Criner GJ, COPDGene Investigators. The Chronic Bronchitic Phenotype of COPD : An Analysis of the COPDGene Study. Chest, 2011, 140, 626–633.

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

Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB. The Natural History of Chronic Airflow Obstruction Revisited. An Analysis of the Framingham Offspring Cohort. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 1, 3-10.

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

Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E, Studnicka M, Bateman E, Anto JM, Burney P, Mannino DM, Buist SA, BOLD Collaborative Research Group. COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. Chest, 2009,139, 752-63.

Lawlor DA, Ebrahim S, Davey Smith G. Association of birth weight with adult lung function: findings from the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis. Thorax, 2005, 60, 851-858.

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

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

MacNee W. Pathology, pathogenesis, and pathophysiology. *BMJ*, 2006, 332, 1202–1204.

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

MacRedmond RE, Greene CM, Dorscheid DR, McElvaney NG, O'Neill SJ. Epithelial expression of TLR4 is modulated in COPD and by steroids, salmeterol and cigarette smoke. *Respir Res*, 2007, 8,84.

Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 2006, 3.

McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of Patients With Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease Have a Significant Risk of Airflow Obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164, 1419-1424.

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

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

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.

Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramírez-Sarmiento A, Antó JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2006, 27, 542-546.

Paulin LM, Diette GB, Blanc PD, Putcha N, Eisner MD, Kanner RE, Belli AJ, Christenson S, Tashkin DP, Han M, Barr RG, Hansel NN, SPIROMICS Research Group. Occupational exposures are associated with worse morbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191, 557-565.

Pauly JL, Smith LA, Rickert MH, Hutson A, Paszkiewicz GM. Review: Is lung inflammation associated with microbes and microbial toxins in cigarette tobacco smoke? Immunol Res, 2010, 46, 127-136.

Projections of mortality and causes of death 2015 and 2030. 2016, www.who.int, pristupljeno 23.3.2016.

Quach A, Giovannelli J, Chérot-Kornobis N, Ciuchete A, Clément G, Matran R, Amouyel P, Edmé JL, Dauchet L. Prevalence and underdiagnosis of airway obstruction among middle-aged adults in northern France: The ELISABET study 2011–2013. *Respir Med*, 2015, 109, 1553–1561.

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

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

Schröder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zähringer U, Göbel UB, Weber JR, Schumann RR. Lipoteichoic Acid (LTA) of Streptococcus pneumoniaeand Staphylococcus aureus Activates Immune Cells via Toll-like Receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 Are Not Involved. J Biol Chem, 2003, 278, 15587-15594.

Silva GE, Sherrill DL, Guerra S, Barbee RA. Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest*, 2004, 126, 59-65.

Stockley RA. Neutrophils and Protease/Antiprotease Imbalance. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160.

Stoller JK, Aboussouan LS. α1-antitrypsin deficiency. *Lancet*, 2005, 365, 2225–2236.

Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol*, 2015, 111, A3.B.1-A3.B.3.

Tager IB, Ngo L, Hanrahan JP. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152,977- 983.

Takeda K, Kaisho T, Akira S Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003, 335-376.

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 2005,. 17, 1-14.

Thomsen M, Nordestgaard BG, Vestbo J, Lange P. Characteristics and outcomes of chronic obstructive pulmonary disease in never smokers in Denmark: a prospective population study. Lancet Respir Med, 2013, 1, 543–550.

THP-1 (ATCC® TIB-202™) 2016, www.lgcstandards-atcc.org, pristupljeno 10.4.2017.

Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori M, Werts C, Boneca IG. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO*, 2004, 5, 1000–1006

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 1980, 26, 171-176.

van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164, 826-830.

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

World Health Organization Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases - A comprehensive approach. 2007., http://www.who.int, pristupljeno 28.3.2017.

Wellnitz O, Arnold ET i Bruckmaier RM. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, 2011, 11, 5405-5412.

Yin P, Jiang CQ, Cheng KK, Lam TH, Lam KH, Miller MR, Zhang WS, Thomas GN, Adab P. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank Cohort Study, *Lancet*, 2007, 370, 751-757.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Kronična opstrukcijska plućna bolest karakterizirana je pojačanom kroničnom upalom dišnih putova i pluća izazvanom stranim česticama i plinovima koja dovodi do stvaranja ispljuvka i razaranja plućnog parenhima. TLR receptori uključeni su u regulaciju urođenog i stečenog imuniteta te imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze pluća. Važni su u obrani od patogena, ali ne dozvoljavaju razvijanje pretjeranog upalnog odgovora koji bi mogao dovesti do oštećenja plućnog tkiva. Smatra se da cigaretni dim i drugi štetni čimbenici, u kombinaciji s genskom predispozicijom, djeluju na TLR receptore, dovode do njihove aktivacije, nakupljanja stanica imunosnog sustava u većem broju u dišnim putovima, otpuštanja upalnih citokina te promjena u ekspresiji gena za TLR receptore što pridonosi razvoju kronične upale.
U ovom istraživanju ispitivala se toksičnost različitih koncentracija agonista TLR receptora LPS-a (agonist TLR4) i LTA (agonist TLR2) na THP-1 humanim monocitnim stanicama. Na taj se način pokušao oponašati upalni odgovor u bolesnika s KOPB-om. Vijabilnost stanica određivala se tripanskim plavilom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH i MTS testom.
Dobiveni rezultati su pokazali da 0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1 μg/ml i 5 μg/ml LPS i LTA uzrokuju porast aktivnosti LDH-a u mediju iznad stanica, odnosno dovode do gubitka integriteta stanične membrane. Prema MTS testu, taj gubitak integriteta stanične membrane ne utječe značajno na metaboličku aktivnost stanica. Stoga zaključujemo da LPS i LTA ipak ne djeluju citotoksično na THP-1 stanice u zadanim koncentracijama.

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

In this research we investigated toxicity of different concentrations of TLR receptor agonists LPS (TLR4 agonist) and LTA (TLR2 agonist) on THP-1 human monocytic cells by mimicking inflammatory responses in COPD patients. Cell viability was determined with Trypan blue, LDH and MTT assays.

According to the results obtained, 0.1 μg/ml, 0.5 μg/ml, 1 μg/ml i 5 μg/ml LPS and LTA cause increase of LDH activity in cell medium and lead to a significant loss of cell membrane integrity. On the other hand, MTS assay showed that the metabolic activity of cells was not significantly altered despite of disturbed cell membrane integrity. Therefore we can conclude that LPS and LTA do not provoke a significant cytotoxic effect on THP-1 cells.

8. PRILOZI

8.1. Popis kratica

AP-1	aktivacijski protein 1 (*engl*. activator protein 1)
ANOVA	test jednosmjerne analize varijanci (*engl*. One Way Analysis of Variance)
BOLD	istraživanje izračuna opterećenja KOPB-a za društvo (*engl*. Burden of Lung Disease)
CAT	test za procjenu KOPB-a (*engl*. COPD Assessment Test)
CD14	stanični marker (*engl*. cluster of differentiation)
CSE	ekstrakt cigaretnog dima (*engl*. cigarette smoke extract)
DAMP	molekulska struktura nastala oštećenjem (*engl*. damage-associated molecular pattern)
ERK	kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (*engl.* extracellular signal-regulated kinase)
FBS	fetalni goveđi serum (*engl*. fetal bovine serum)
FEV_1	forsirani izdisajni volumen u jednoj sekundi (*engl*. forced expired volume in 1 second)
GOLD	Svjetska inicijativa za kroničnu opstrukcijsku plućnu bolest (*engl*. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)
IL	interleukin
IL-1R	receptor za IL-1 (*engl*. interleukin-1 receptor)
IRAK	kinaza povezana s receptorom za IL-1 (*engl*. IL-1R associated kinase)
I-κB	inhibicijski kappa B protein (*engl*. inhibitory kappa B)
JNK	kinaza koja fosforilira N-kraj transkripcijskog čimbenika c-Jun (*engl*. c-Jun N-terminal kinase)
KOPB	kronična opstrukcijska plućna bolest
LDH	laktat dehidrogenaza
LPB	protein koji veže LPS (*engl.* LPS-binding protein)
LPS	lipopolisaharid (*engl*. lipopolysaccharide)
LRR	ponavljajući slijed bogat leucinom (*engl*. leucine-rich repeat)
LTA	lipoteikoična kiselinu (*engl*. lipoteichoic acid)
Mal	adaptacijski protein sličan MyD88 (*engl*. MyD88 adaptor-like)
MAPK	protein-kinaza aktivirana mitogenom (*engl*. mitogen-activated protein kinase)
MKK6	kinaza 6 MAPK (*engl*. mitogen-activated protein kinase kinase 6)

mMRC	modificirani upitnik Vijeća za medicinska istraživanja (*engl*. modified Medical research council)
MyD88	čimbenik mijeloidne diferencijacije 88 (*engl*. myeloid differentiation factor 88)
NF-κB	jezgrin čimbenik kappa B (*engl*. nuclear factor kappa B)
NLR	receptor sličan oligomerizacijskoj domeni koja veže nukleotide (*engl*. nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor)
PAMP	molekulska struktura različitih mikroorganizama (*engl*. pathogen-associated molecular pattern)
PRR	receptor koji prepoznaje molekulske strukture (*engl*. pattern recognition receptor)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. ribonucleic acid)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (*engl*. reactive oxygen species)
SARM	protein koji sadrži sterilne alfa i Armadillo motive (*engl*. sterile-alpha and Armadillo motif containing protein)
SEM	standardna pogreška (engl. *standard error of mean*)
TAK1	kinaza 1 koju aktivira transformirajući čimbenik rasta β (*engl*. transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase 1)
Th	T-pomagačke stanice (*engl*. T-helper cells)
Tc	citotoksični T limfociti (*engl*. cytotoxic T lymphocyte)
THP-1	stanice akutne monocitne leukemije originalno izolirane iz periferne krvi jednogodišnjeg muškog djeteta
TIR	domena homologna kod TLR i IL-1 receptora (*engl*. Toll/interleukin-1 receptor homology domain)
TIRAP	adaptacijski protein s TIR domenom (*engl*. TIR adaptor protein)
TLR	receptor sličan Toll receptoru *Drosophila* vrste (*engl*. Toll-like receptor)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze α (*engl*. tumour necrosis factor α)
TRAF6	čimbenik 6 povezan s TNF receptorom (*engl.* TNF-receptor-associated factor 6)
TRAM	adaptacijska molekula srodna TRIF-u (*engl*.TRIF-related adaptor molecule*)*
TRIF	adaptacijski protein s TIR domenom koji inducira interferon β (*engl*. TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β)
VEGF	vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl*. vascular endothelial growth factor)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization)

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ AGONISTA TLR RECEPTORA NA VIJABILNOST THP-1 HUMANIH MONOCITNIH STANICA

Tina Smoljanović

SAŽETAK

Kronična opstrukcijska plućna bolest karakterizirana je pojačanom kroničnom upalom dišnih putova i pluća izazvanom stranim česticama i plinovima koja dovodi do stvaranja ispljuvka i razaranja plućnog parenhima. TLR receptori uključeni su u regulaciju urođenog i stečenog imuniteta te imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze pluća. Važni su u obrani od patogena, ali ne dozvoljavaju razvijanje pretjeranog upalnog odgovora koji bi mogao dovesti do oštećenja plućnog tkiva. Smatra se da cigaretni dim i drugi štetni čimbenici, u kombinaciji s genskom predispozicijom, djeluju na TLR receptore, dovode do njihove aktivacije, nakupljanja stanica imunosnog sustava u većem broju u dišnim putovima, otpuštanja upalnih citokina te promjena u ekspresiji gena za TLR receptore što pridonosi razvoju kronične upale.

U ovom istraživanju ispitivala se toksičnost različitih koncentracija agonista TLR receptora LPS-a (agonist TLR4) i LTA (agonist TLR2) na THP-1 humanim monocitnim stanicama. Na taj se način pokušao oponašati upalni odgovor u bolesnika s KOPB-om. Vijabilnost stanica određivala se tripanskim plavilom, određivanjem katalitičke aktivnosti LDH i MTS testom.

Dobiveni rezultati su pokazali da 0,1 μg/ml, 0,5 μg/ml, 1 μg/ml i 5 μg/ml LPS i LTA uzrokuju porast aktivnosti LDH-a u mediju iznad stanica, odnosno dovode do gubitka integriteta stanične membrane. Prema MTS testu, taj gubitak integriteta stanične membrane ne utječe značajno na metaboličku aktivnost stanica. Stoga zaključujemo da LPS i LTA ipak ne djeluju citotoksično na THP-1 stanice u zadanim koncentracijama.

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

Rad sadrži: 55 stranica, 12 grafičkih prikaza, 2 tablice i 71 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: lipopolisaharid, lipoteikoična kiselina, TLR receptori, kronična opstrukcijska plućna bolest, THP-1 stanice, vijabilnost,

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

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Lada Rumora**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *viša asistentica – znanstvena novakinja Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Doc. dr. sc. Petra Turčić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

EFFECT OF TLR RECEPTOR AGONISTS ON THP-1 CELL VIABILITY

Tina Smoljanović

SUMMARY

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

In this research we investigated toxicity of different concentrations of TLR receptor agonists LPS (TLR4 agonist) and LTA (TLR2 agonist) on THP-1 human monocytic cells by mimicking inflammatory responses in COPD patients. Cell viability was determined with Trypan blue, LDH and MTT assays.

According to the results obtained, 0.1 μg/ml, 0.5 μg/ml, 1 μg/ml i 5 μg/ml LPS and LTA cause increase of LDH activity in cell medium and lead to a significant loss of cell membrane integrity. On the other hand, MTS assay showed that the metabolic activity of cells was not significantly altered despite of disturbed cell membrane integrity. Therefore we can conclude that LPS and LTA do not provoke a significant cytotoxic effect on THP-1 cells.

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

Thesis includes: 55 pages, 12 figures, 2 tables and 71 references. Original is in Croatian language.

Keywords: lipopolysaccharide, lipotheicoic acid, TLR receptors, chronic obstructive pulmonary diease, THP-1 cells, viability

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

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

Anita Somborac Bačura, *Senior Assistant – Research Associate*, 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: July, 2017